



Imobilização de Enzimas por Display Celular: Uma Alternativa Industrial?

Victor Hugo Neves Almeida

Monografia em Engenharia de Bioprocessos.

Orientadores

Prof. Maria Alice Zarur Coelho, DSc

Prof. Ivaldo Itabaiana Jr, DSc

Dezembro de 2020

IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS POR DISPLAY CELULAR: UMA ALTERNATIVA INDUSTRIAL?

Victor Hugo Neves Almeida

Monografia em Engenharia de Bioprocessos submetida ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Aprovado por:

Jose Angel Ramon Hernandez, DSc

Tatiana Felix Ferreira, DSc

Ivaldo Itabaiana Jr, DSc

Orientado por:

Ivaldo Itabaiana Jr, DSc

Maria Alice Zarur Coelho, DSc

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Dezembro de 2020

Neves, Victor Hugo.

Imobilização de enzimas por display celular: Uma alternativa industrial? /Victor Hugo Neves Almeida. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2020.

xi, 41 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2020.

Orientadores: Maria Alice Zarur Coelho e Ivaldo Itabaiana Jr

1.Display. 2. Superfície celular. 3. Biocatálise. 4.Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Maria Alice Zarur Coelho, Ivaldo Itabaiana Jr I. Imobilização de enzimas por display celular: Uma alternativa industrial?

Dedico a minha mãe e meus amigos,
que me deram força para chegar até o final

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus orientadores Maria Alice Zarur Coelho e Ivaldo Itabaiana Jr, por aceitarem esta proposta e por me ajudarem durante esta fase tão difícil que foi a pandemia, pelas reuniões durante o processo de pesquisa e escrita entre tantos compromissos e confusões que essa quarenta causou na vida de todos. Obrigado!

Gostaria de agradecer também aos meus amigos, todos que estiveram comigo nessa longa jornada, não foi fácil para mim, e provavelmente, em alguns momentos, também não foi fácil para eles, porque me aturar de mal humor pode não ser fácil, mas cada momento de distração, de diversão, de esquecer dos problemas acadêmicos e da vida foram essenciais para passar por tudo isso.

Por fim, gostaria de agradecer a minha mãe, maior exemplo que tenho de superação e de sucesso, de aproveitar as oportunidades que aparecem e se agarrar com tudo a elas e sempre me mostrar como me manter forte e encarar os problemas que possam aparecer de frente. Muito obrigado!

Agradeço também aos integrantes da banca por aceitarem meu convite.

Resumo da Monografia apresentada à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS POR DISPLAY CELULAR: UMA ALTERNATIVA INDUSTRIAL?

Victor Hugo Neves Almeida

Dezembro, 2020

Orientadores: Prof. Maria Alice Zarur Coelho, DSc

Prof. Ivaldo Itabaiana Jr, DSc

A imobilização de enzimas por display em superfície celular é uma tecnologia com grande potencial para uso industrial pois combina vantagens do uso de técnicas *whole cell* e de imobilização de enzimas. Somado a isso a tecnologia do DNA recombinante permitiu construir diferentes sistemas utilizando plataformas de células, proteínas âncoras e enzimas diferentes, aumentando assim, as opções para chegar-se no objetivo desejado, enzimas mais estáveis, com maior atividade para aplicações específicas. O display em superfície celular ainda está em desenvolvimento e muitos trabalhos têm sido feitos. Utilizando as plataformas do *Science direct* para artigos científicos e *Scopus* para patentes uma prospecção tecnológica foi realizada para estudar o desenvolvimento da tecnologia nos últimos 10 anos, aplicando, a ambos análises, macro, meso e micro. Parâmetros como áreas que estão sendo mais aplicadas, os sistemas mais utilizados, enzimas e reações biocatalíticas mais exploradas, assim como perfil, se acadêmico, ou empresarial das entidades que estão produzindo os artigos e aplicando as patentes. Através dos dados obtidos na prospecção, 76 artigos e 50 patentes, foi possível perceber o aumento de publicações de artigos acadêmicos sobre o assunto a partir, principalmente de 2012, enquanto, em relação as patentes o aumento mais expressivo se deu a partir de 2002. Os dados mostraram também a variedade de aplicações, como para produção de biocombustíveis, biosensores e biorremediação, enzimas e sistemas passíveis de aplicação da tecnologia, indicando que, apesar de ainda não ser amplamente aplicada no setor industrial, pode ser instituída uma vez que os estudos sejam aprofundados e a tecnologia desenvolvida o suficiente.

ÍNDICE

I.	Introdução.....	1
II.	Objetivo	3
III.	Revisão Bibliográfica	4
	III.1 Enzimas.....	4
	III.2 Imobilização.....	6
	III.3 Tecnologia de Display Celular e plataformas utilizadas	8
	III.4 Métodos de Display em Bactérias	10
	III.4.1 Gram Negativas.....	10
	III.4.2 Gram Positivas	12
	III.5 Métodos de Display em leveduras	14
	III.5.1 – GPI.....	15
	III.5.2 – Aga.....	15
	III.6 Aplicações.....	16
IV.	Prospecção tecnológica	17
	IV.1 Metodologia	17
	IV.1.1 Bases e Buscas	17
	IV.2 Análise Macro.....	17
	IV.3 Análise Meso	18
	IV.4 Análise Micro	18
	IV.5 Critérios de relevância.....	19
	IV.6 Vosviewer	19
V.	Resultados e Discussões	20
	V.1 Definição das palavras-chaves	20
	V.2 Artigos científicos	21
	V.2.1 Análise Macro	21
	V.2.2 Análise Meso.....	25

V.2.3 Análise Micro	26
V.3 Patentes	28
V.3.1 Análise Macro	28
V.3.2 Análise Meso.....	29
V.3.3 Análise Micro	30
V.4 Critérios de relevância	31
V.5 Vosviewer	34
VI. Conclusões	36
VII. Referências Bibliográficas.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura III.1** Potencial biosintético de fábricas celulares
- Figura III.2** Métodos de imobilização de células
- Figura III.3** Display de PETase em superfície de levedura
- Figura III.4** Esquema de membrana celular de bactéria gram negativa
- Figura III.5** Representação esquemática de proteínas âncora para o display em superfície de bactéria gram negativa
- Figura III.6** Esquema de membrana e parede celular de bactéria gram positiva
- Figura III.7** Representação esquemática de proteínas âncora para o display em superfície de bactéria gram positiva
- Figura III.8** Esquema de membrana e parede celular de levedura
- Figura III.9** Sistema de display em superfície celular de *S.cerevisiae*
- Figura V.10** Número de publicações desde 1993 contendo as palavras chaves “display”, “cell surface”, “enzyme” e “surface display” (dados obtidos na base *Science Direct*).
- Figura V.11** Número de publicações dos artigos científicos utilizados na análise, desde 2010, contendo as palavras chaves “display”, “cell surface”, “enzyme” e “surface display” (dados obtidos na base *Science Direct*).
- Figura V.12** Distribuição geográfica dos países que publicaram os artigos científicos utilizados na análise
- Figura V.13** Número de artigos científicos classificados por plataformas
- Figura V.14** Número de artigos científicos classificados em cada taxonomia adotada na análise Meso
- Figura V.15** Distribuição no período entre 2010 e 2020 das patentes analisadas (fonte: base de dados *Scopus*)
- Figura V.16** Países que aplicaram patentes utilizadas na análise entre os anos de 2010 e 2020.
- Figura V.17** Número de patentes classificadas para as taxonomias definidas na análise Meso
- Figura V.18** Classificação das patentes utilizadas na análise por plataformas
- Figura V.19** Mapas de relações entre palavras chaves gerado pelo Vosviewer

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela II.1 Tipos e classificação de suportes utilizados para imobilização de enzimas

Tabela III.2 Taxonomias utilizadas para classificar os artigos científicos e patentes na prospecção tecnológica e suas descrições

Tabela IV.3 Revistas científicas e número de publicações

Tabela IV.4 Médias dos critérios subjetivos dos artigos científicos utilizados na Prospecção Tecnológica

NOMENCLATURA

LETRAS LATINAS

Símbolo	Descrição
WC	Whole cell
GPI	Glicosyl phosphatidyl inositol
INP	Ice nucleation protein
Omp	Outer membrane proteins
CDR	Central domain repetition
AIDA-I	Adhesin involved in diffuse adherence

I. Introdução

A biocatálise é definida como o uso de substâncias naturais, as quais incluem enzimas, de fontes biológicas ou *Whole cell* (WC), que significa célula inteira, ou, mais comumente chamado, célula íntegra, para acelerar reações químicas. Estas enzimas podem ser utilizadas na forma de preparos isolados ou em formato WC, produzidas nas suas células nativas, ou como proteínas recombinantes expressas em células hospedeiras alternativas. O uso da biocatálise se expandiu significativamente durante as últimas décadas, e impactou sínteses químicas em múltiplas indústrias como a farmacêutica, química fina e de alimentos (TRUPPO, 2017). As enzimas aceleram as reações químicas e são produzidas, tipicamente, por tecidos vegetal, tecido animal e microrganismos como bactérias, fungos, leveduras. São moléculas proteicas produzidas dentro de células vivas e podem funcionar *in vitro* (KAUSHIK; BISWAS; SINGH, 2014).

Uma das vantagens do uso de enzimas é sua alta especificidade em relação aos substratos, como a regio especificidade (em relação à posição), a enantiosseletividade (em relação à quiralidade) e a quimiosseletividade (em relação aos grupos funcionais)(SCHÜRMANN *et al.*, 2014), o que indica que, para cada ocasião, haveria uma enzima que seria ideal para a reação. A alta especificidade das enzimas, se apresentou como uma grande vantagem, porém o advento da engenharia de proteínas com a utilização da tecnologia de DNA recombinante associada a várias técnicas de edição genética e transformação de células se mostrou um conjunto de ferramentas poderoso para a aplicação, uma vez que, com essas ferramentas, pode-se atingir a especificidade desejada para uma reação que até então não era conhecida, permitindo-se obter enzimas mais competitivas para os processos.

Os preparos isolados de enzimas podem ser utilizados em formas de enzimas livres, onde estas são produzidas no interior dos microrganismos. Porém, por meio de vários processos, são retiradas, separadas e purificadas para o uso, ou podem ser imobilizadas onde passam por mais um processo nos quais são associadas a uma matriz, que pode variar, desde materiais sintéticos até matrizes naturais. O WC é quando se utiliza um meio de cultura contendo células vivas, onde o produto desejado é um resultado natural da atividade destes microrganismos. Neste caso, as enzimas podem estar agindo intracelularmente ou ainda podem ser secretadas e agindo no meio extracelular.

Por fim, há o display celular de enzimas em superfície celular, uma tecnologia recente capaz de auto imobilizar proteínas alvo na superfície celular de microrganismos fazendo a fusão entre esta e outra proteína âncora, e se mostrou como uma ferramenta promissora, com um bom custo benefício para aplicações industriais (DONG *et al.*, 2020). É uma tecnologia versátil, onde o sistema de ancoragem depende da célula que está sendo usada como plataforma, havendo técnicas específicas para cada uma, como a utilização do sistema de secreção do tipo V, as autotransportadoras, como âncoras para bactérias gram negativas e a âncora glicosil phosphatidil inositol (GPI) para leveduras, abrindo uma grande variedade de combinações possíveis para o sistema plataforma, proteína âncora e enzima, fato que permite que se encontre combinações que demonstrem maiores atividades enzimáticas, graças a tecnologia de DNA recombinante. A tecnologia do display de enzimas em superfície celular possui grande potencial pois associa vantagens de estratégias celulares como o WC e de enzimas livres e imobilizadas.

II. Objetivo

O objetivo deste trabalho é enumerar o estado de arte sobre a tecnologia do display de enzimas em superfície celular, suas vantagens e limitações, suas possibilidades de plataformas e sistemas de obtenção. Adicionalmente o desenvolvimento dessa nova tecnologia nos últimos 10 anos foi avaliada através de prospecção tecnológica, a partir da análise de artigos científicos e de patentes, tendo como parâmetros as áreas nas quais tem sido aplicada bem como as técnicas e plataformas mais utilizadas.

III. Revisão Bibliográfica

III.1 Enzimas

Enzimas são catalisadores naturais produzidos por organismos vivos, e estão envolvidas em todos os processos essenciais para a vida, como a replicação e transcrição do DNA, síntese proteica, metabolismo e tradução de sinais (JIANG; MA; LU, 2020). Os microrganismos utilizam uma grande variedade de enzimas para realizar suas funções vitais. Um substrato sofre uma série de modificações, através de reações químicas, até se transformar no produto final, tanto produtos intermediários destas reações quanto produtos finais podem ser de grande interesse econômico.

Portanto, no âmbito industrial, quando utilizamos algum microrganismo para fazer uma biotransformação, estamos fazendo uso de suas enzimas para realizar o processo desejado. Estes processos vêm sendo usados por muitos anos, das mais variadas formas. Um método comumente utilizado para produção de etanol, por exemplo, é a fermentação contínua de açúcares com a participação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CIESIELSKI; GRZYWACZ, 2020), sendo utilizada, tanto para produção de etanol combustível, quanto para produção de bebidas alcoólicas. Além de *Saccharomyces cerevisiae*, muitos microrganismos como *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, foram projetados com sucesso para serem fábricas celulares (Figura 1) ideais para produção industrial de compostos de valor agregado (XU *et al.*, 2020).

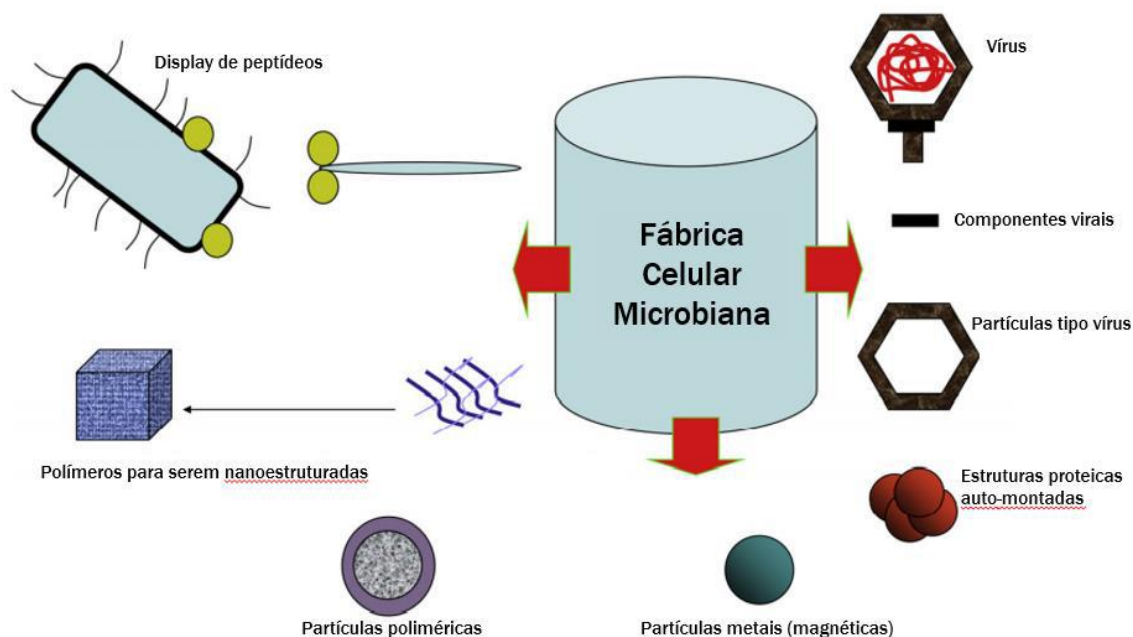


Figura 1: Potencial biosintético de fábricas celulares. Adaptado de (VILLAYERDE, 2010)

Este processo foi um dos primeiros a ser utilizado em função da sua simplicidade. Além de não necessitar de pré-tratamento, uma vez que o processo é natural, não há a necessidade de adicionar cofatores, há a possibilidade de haver reações em cascatas, podem ser feitas diversas reações com o mesmo biocatalisador. Em contrapartida essa prática também possui suas desvantagens como a possibilidade de haver reações secundárias em função das vias metabólicas, em alguns casos a dificuldade de recuperação do produto, e a baixa permeabilidade devido a membrana celular (PINTO; CONTENTE; TAMBORINI, 2020).

Visando superar algumas das desvantagens apresentadas, o uso de enzimas purificadas solubilizadas no meio de cultura se apresentou como uma alternativa ao WC. O fato de utilizar-se enzimas específicas permite o controle da reação e dificulta/evita a ocorrência de reações secundárias. O uso de enzimas purificadas restringe a ocorrência de produtos secundários da reação tornando mais fácil a separação do produto principal do meio. Somando-se a isso, a ausência de membrana e de parede celular é uma vantagem no quesito permeabilidade pois há uma limitação menor na transferência de massa e, por fim, sem os mecanismos naturais das células não há inibição por altas concentrações de substrato ou produto em função do metabolismo (LIN; TAO, 2017). Em WC, o produto de interesse é um dos subprodutos do metabolismo celular, porém não é o único produzido, o que pode dificultar a separação deste produto dos outros metabólitos produzidos e secretados pelas células. Este caso ocorre quando a célula secreta o produto de interesse para o meio extracelular, mas há ainda situações em que isso não acontece e o produto fica retido dentro da membrana celular, o que faz com que seja necessário fazer a lise das células para se ter acesso ao produto.

Porém, a necessidade de purificar as enzimas envolve um processo que consome muito tempo, é custoso para o preparo, e, somado a isso, o fato de o preparado enzimático só poder ser usado apenas uma vez para a reação, tornando-o, ao final do processo, um resíduo (SCHÜÜRMAN *et al.*, 2014). Isso faz com que este processo tenha um custo operacional grande. Aliado a isso, o fato da biocatálise não estar acontecendo no ambiente celular, ou seja, dentro ou nos arredores da célula, pode diminuir a estabilidade enzimática, e, caso a enzima precise de cofatores para manter a sua atividade, estes terão que ser adicionados ao meio reacional.

III.2 Imobilização

A imobilização enzimática supera algumas das dificuldades apresentadas pelo uso de enzimas purificadas como a facilidade de separação e custos reduzidos dos processos *downstream*, a possibilidade de vários ciclos de reuso, a melhor estabilidade enzimática, principalmente em solventes orgânicos e em maiores temperaturas, o uso de reatores de leito fixo ou batelada, sem a necessidade de membranas para isolar a enzima do produto, e a possibilidade de co-imobilização com outras enzimas (BASSO; SERBAN, 2019).

Qualquer protocolo de imobilização precisa levar em consideração diversos aspectos como as propriedades dos suportes, o grupo ativo do suporte utilizado para a imobilização da enzima assim como o da própria enzima, com os quais serão feitas as ligações entre enzima e suporte, e o método utilizado para a imobilização (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020). A seleção de um suporte deve analisar as características físicas, químicas e morfológicas, bem como a possibilidade de regeneração do material e sua influência quanto a enzima imobilizada (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014), como a estabilidade de fixação da enzima no suporte, a estabilidade enzimática, a resistência mecânica e a capacidade de carga. Os suportes são classificados de acordo com a sua natureza e composição (Tabela 1).

As enzimas podem ser ligadas ao suporte sólido ou fisicamente confinada no interior de uma matriz e a classificação do método pode ser considerada quanto ao tipo de interação responsável pela ligação da enzima no suporte, como meios químicos e físicos, ou a natureza do suporte, poroso ou não poroso, e estes métodos são divididos em três categorias, adsorção em um suporte, ligação covalente em um suporte e encapsulamento (Figura 2) (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014).

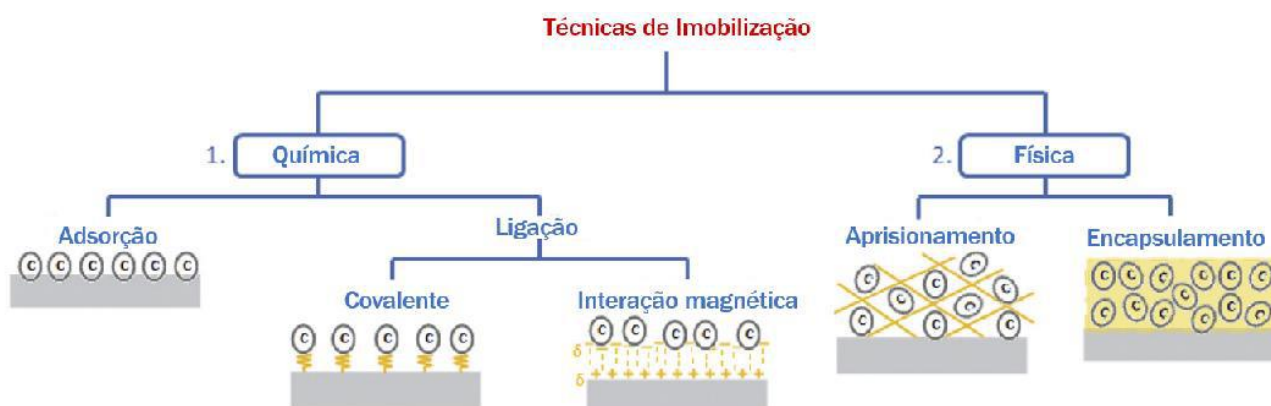


Figura 2: Métodos de imobilização de células. Adaptado de (PINTO; CONTENTE; TAMBORINI, 2020)

A interação entre suporte e enzima irá fornecer ao biocatalisador imobilizado as suas propriedades bioquímicas, mecânicas e cinéticas, desta forma, para que haja maior contribuição para o bom desempenho desta enzima, é necessário o aprimoramento destes suportes, por exemplo, por meio de modificações de sua morfologia com aditivos e/ou estabilizantes para aplicação destes na imobilização das enzimas, assegurando a estabilidade (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014), ou ainda, incluindo grupos reativos na superfície do suporte.

Tabela 1: Tipos e classificação de suportes utilizados para imobilização de enzimas.

Adaptado de (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014)

Natureza	Classificação do suporte	Suporte
Natural	Orgânico	Bagaço de cana-de-açúcar
		Quitosana
		Fibra de coco
	Inorgânico	Nanofibra
		Argila
		Sílica
Sintético	Orgânico	Poliuretano
		Poliestireno
		PHBV
		Polipropileno
		Eupergit C
	Inorgânicos e Orgânicos	POS-PVA
		Sílica
	Inorgânicos	Nanopartícula de Fe_3O_4
		Alumina

Porém, o custo adicional dos suportes, possíveis exigências adicionais de purificação do catalisador, técnicas pouco adequadas a substratos insolúveis ou de alto

peso molecular, maiores riscos de contaminação na operação contínua dos reatores, restrições difusionais e impedimento estéreo são limitações desta forma de imobilização.

Os métodos de imobilização são amplamente estudados e estão em constante evolução tendo como objetivo aumentar a produtividade a partir da interação das enzimas com o suporte e com o meio em que estão inseridas. Microrganismos naturalmente expressam proteínas que tem como objetivo final a membrana externa ou parede celular, fazendo o display destas para o meio externo. Desta forma, a utilização da própria célula como suporte para a imobilização de enzimas em sua superfície se mostrou como uma ferramenta com um custo benefício promissor para aplicações industriais (DONG *et al.*, 2020).

III.3 Tecnologia de Display Celular e plataformas utilizadas

Display celular é a mobilização de estruturas proteicas, ancoradas na superfície celular, de forma que, pelo menos, um domínio proteico, responsável pela atividade desejada, esteja em contato com o meio extracelular (Figura 3). A tecnologia do DNA recombinante permitiu expressar, de forma heteróloga polipeptídeos e proteínas, em diversas plataformas como fagos, fungos, vírus, leveduras e bactérias (SUN *et al.*, 2015), com uma ampla variedade de aplicações, como bioadsorventes, produção celular de biosensores, desenvolvimento de novas vacinas, triagem de bibliotecas de peptídeos e biocatálise (CHMIELEWSKI *et al.*, 2019).

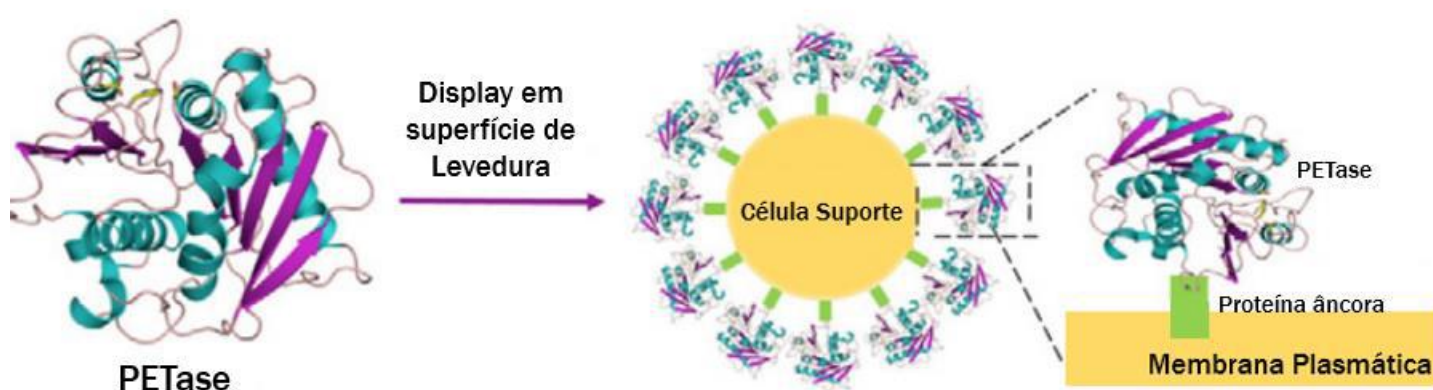


Figura 3: Display de PETase em superfície de levedura. Adaptado de (CHEN, Zhuozhi *et al.*, 2020)

A tecnologia do DNA recombinante já vinha sendo utilizada para expressão heteróloga de enzimas. Porém, a purificação destas enzimas heterólogas da célula hospedeira, se apresenta como um grande desafio, e pode representar até 80% do custo de produção total. Em uma perspectiva de processo, enzimas purificadas são difíceis de serem reutilizadas, e de serem separadas do meio de reação (GUPTA; NORONHA, 2020). O uso de tecnologia WC permite que os microrganismos executem a biocatálise, reduzindo significativamente o número de etapas necessárias para o processo downstream. No entanto, a tecnologia WC intracelular é limitada pela transferência de massa, em função das membranas celulares, e pela competição com as reações metabólicas intracelulares. Desta forma, uma solução para estes desafios é fazer o display da enzima na superfície dos microrganismo, combinando a síntese e a imobilização enzimática em um único passo (HÖRNSTRÖM *et al.*, 2019).

Expressar uma enzima na superfície celular através da tecnologia de display celular remove a necessidade da sua purificação, uma vez que a enzima possui livre acesso ao substrato presente no meio reacional exterior a célula. Portanto, estas células recombinantes podem ser usadas diretamente para catálise sem a necessidade de lisar a célula e, em consequência, pode contornar um grande número de etapas de purificação de proteínas. As células podem ser, simplesmente, recuperadas da mistura de reação por centrifugação e reutilizadas para reações futuras. Consequentemente, este processo permite a reciclagem dos catalisadores e uma recuperação simples do produto. Além disso a anexação da enzima à superfície celular foi reportada como uma maneira de aumentar a sua termo estabilidade (GUPTA; NORONHA, 2020).

A estratégia para display, em superfície celular, de enzimas envolve a expressão da enzima heteróloga alvo, sendo resultado da fusão com uma proteína de superfície natural da célula hospedeira, ou uma proteína âncora (GUPTA; NORONHA, 2020). O display celular de enzimas é uma ferramenta muito flexível pois permite a combinação de diferentes microrganismos, proteínas âncoras, e enzimas, cada um desses elementos adicionando uma particularidade na combinação. Existem inúmeras proteínas que podem ser usadas como âncoras, e essa escolha influencia na atividade final da enzima, assim como, se esta ficará firmemente anexada a superfície celular, ou se haverá clivagem da enzima, concentrando sua atividade no sobrenadante (DUQUESNE *et al.*, 2014). Condições específicas da fusão podem influenciar na eficiência de imobilização, estabilidade, modificações pós traducionais das proteínas, no caso das plataformas que as realizam, e atividade específica (TEPARIC; MRSA, 2016).

III.4 Métodos de Display em Bactérias

III.4.1 Gram Negativas

As bactérias gram negativas possuem duas camadas de membranas, a interna e externa, e, entre elas uma monocamada de peptidoglicanos (Figura 4). Em bactérias Gram-negativas duas proteínas âncoras se destacam em relação a sua aplicação biotecnológica, as “proteínas de nucleação fria” (Ice Nucleation Protein, INP), e as autotransportadoras. Porém, o display celular de enzimas utilizando outras proteínas externas de membrana, (Outer membrane proteins, Omp), como OprF truncada, também é uma opção viável (SCHÜÜRMANN *et al.*, 2014).

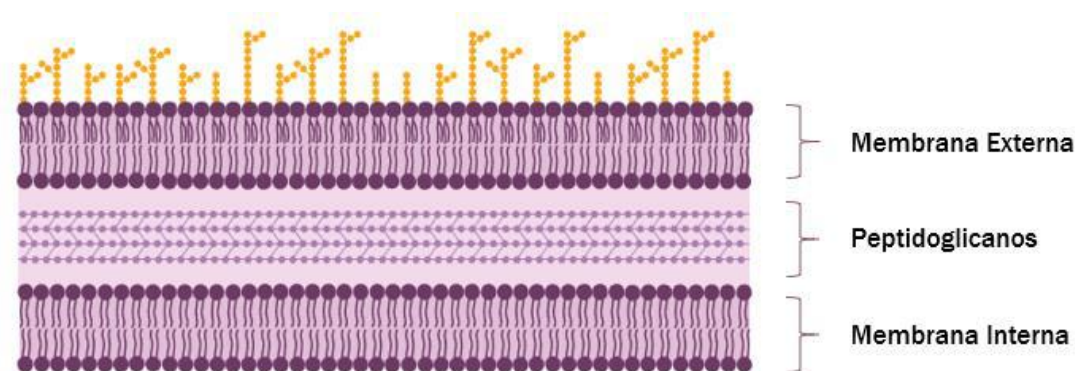


Figura 4: Esquema de membrana celular de bactéria gram negativa. Criado em Biorender.com

A INP é um sistema estável com efeitos insignificantes na integridade da membrana externa e no crescimento celular, e é útil não apenas no display de grandes proteínas, até 119KDa, como também de enzimas que necessitam de cofatores. É encontrada em bactérias associadas a plantas como as do gênero *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Erwinia*. INPs podem causar fermentos de frio em plantas, uma vez que são capazes de gerar cristais de nucleação ao congelar, quando em águas super esfriadas. A estrutura básica da INP consiste de três domínios, o N-terminal, o domínio central de repetição CDR, e o C-terminal. O domínio N-terminal corresponde a cerca de 15% da estrutura total, é hidrofóbico, e é responsável pela ancoragem da proteína na membrana externa. O domínio CDR é a seção mais longa da INP, aproximadamente 81%, e consiste de repetições com 8-, 16-, e 48- resíduos de periodicidade o que fornece o modelo para a formação dos cristais de gelo em água super esfriadas. O domínio C-terminal é hidrofílico e é o local de fusão da enzima heteróloga desejada para o display em superfície. Provavelmente é ancorada à membrana externa via sistema GPI, onde a proteína alvo é ligada a uma proteína de parede celular, que raramente é encontrada em

procariotos, porém é comum em eucariotos(WEE *et al.*, 2019) e será mencionada mais à frente.

A INP mais comum é a InaK, porém outras foram estudadas como InaV, InaPb e InaZ. Apesar das vantagens conhecidas, uma desvantagem desta proteína é que apenas uma fração da INP expressa é transportada de forma eficiente para a membrana externa enquanto o resto das proteínas permanecem no citoplasma e sofrem proteólise, o que reduz o potencial da célula como biocatalisador(Figura 5) (WEE *et al.*, 2019).

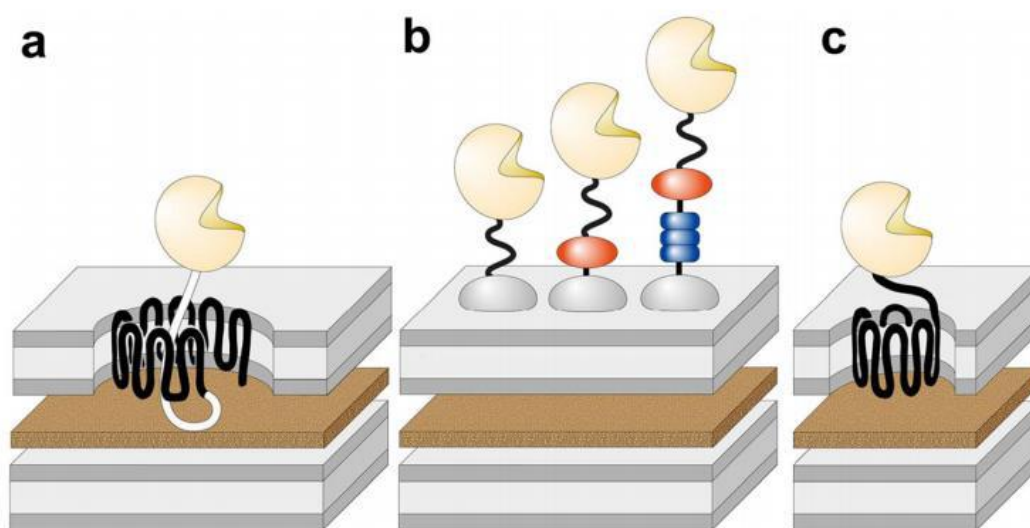


Figura 5: Representação esquemática de proteínas âncora para o display em superfície de bactérias gram negativas. a) autotransportadora; b) INP e suas variações truncadas; c) outras proteínas de membrana externa (OmpW,OprF). Adaptado de (SCHÜÜRMAN *et al.*, 2014)

Autotransportadoras pertencem ao sistema de secreção do tipo V e são encontradas em todas as bactérias gram negativas. Estas utilizam esse sistema para levar proteínas para a superfície celular e o espaço extracelular. O sistema de secreção do tipo V é essencial para a patogenicidade, e, recentemente uma análise sistemática do genoma, identificou supostamente mais que 1500 autotransportadoras. Para aplicações biotecnológicas, as chamadas autotransportadoras clássicas, monoméricas, possuem características favoráveis como a modularidade e a simplicidade aparente. Em geral, uma autotransportadora típica consiste de um peptídeo sinal para translocação através da membrana interna, um domínio passageiro, uma unidade de translocação, que consiste de um ligador, e um domínio barril β , que facilita a exposição do domínio passageiro na superfície celular.

O display em superfície, de passageiros heterólogos, pode ser alcançado substituindo o passageiro natural ou se ligando ao mesmo. Enquanto não foram encontradas diferenças nas substituições e fusões de vários passageiros utilizando a autotransportadora EstA, o domínio do passageiro nativo da autotransportadora IcsA aumentou a expressão de proteínas heterólogas na superfície celular. Até agora a adesina envolvida em aderência difusa (AIDA-I) da *E.coli* enteropatogênica e a EstA de *Pseudomonas aeruginosa* são as autotransportadoras mais aplicadas para biocatálise de WC (SCHÜRMANN *et al.*, 2014).

As Omp tem como vantagem a expressão estável, foram usadas para display em superfície celular as OmpA, OmpC, OmpS, TraT(PARK; KIM; MIN, 2017). OprF é uma proteína de membrana externa importante de *P.aeruginosa* que forma uma estrutura barril- β com epítomos conservados, os quais são locais de fusão para o display. OmpW é uma proteína de membrana pequena de *E.coli* e também forma uma estrutura barril- β que permite display de enzimas em superfície a partir de vários truncamentos C-terminais fundidos a proteínas heterólogas (SCHÜRMANN *et al.*, 2014).

III.4.2 Gram Positivas

As bactérias gram positivas possuem uma membrana celular, e uma camada externa mais espessa, a parede celular, composta de peptidoglicanos (Figura 6). Este fato permite utilizar dois tipos de display diferentes: um onde a ancoragem é feita na membrana plasmática, e outro onde a ancoragem é feita na parede celular.

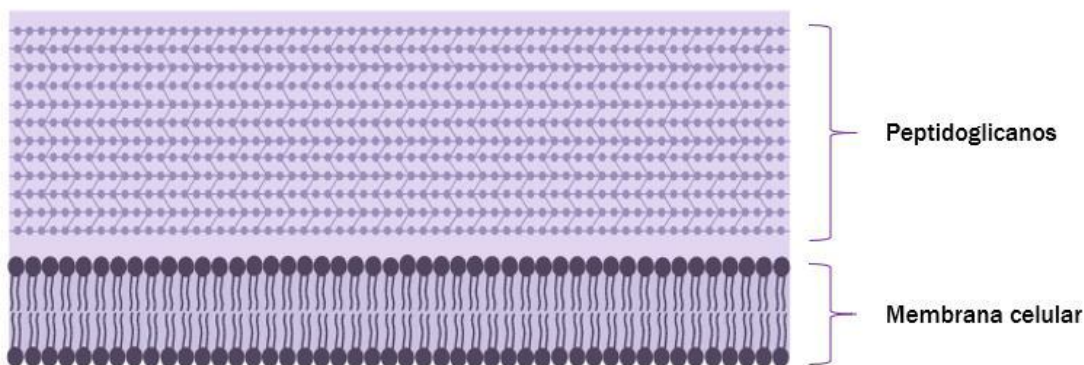


Figura 6: Esquema de membrana e parede celular de bactéria gram positiva. Criado em Biorender.com

Existem duas maneiras principais, diferentes, de ancorar uma proteína secretada à parede celular: de forma covalente, através da enzima sortase; e não covalentemente, via

domínios proteicos que interagem fortemente com os componentes da parede celular. Na ancoragem mediada pela sortase, a proteína secretada carrega uma âncora C-terminal contendo a região LPXTG, um sinal reconhecido pela enzima sortase, seguida por um domínio hidrofóbico e uma cauda carregada positivamente. O domínio hidrofóbico e a cauda carregada impedem que a proteína seja liberada para o meio, permitindo o reconhecimento da região LPXTG por uma transpeptidase associada à membrana chamada sortase. Esta enzima cliva a ligação peptídica entre a treonina e a glicina na região LPXTG e liga a treonina, a qual agora possui um C-terminal a uma pentaglicina na parede celular. Um dos sistemas de display não covalentes explora os domínios chamados LysM, local de ligação dos peptidoglicanos, os quais são conhecidos por promover associação à parede celular de várias proteínas naturais a partir da fusão do domínio C-terminal ou N-terminal à proteína alvo (PHAM *et al.*, 2019).

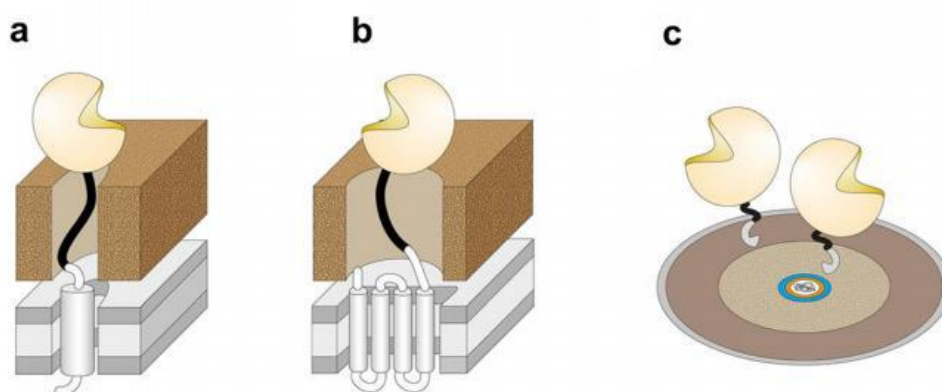


Figura 7: Representação esquemática de proteínas âncora para o display em superfície de bactéria gram positiva. a) PgsA; b) NCgl1221; c) display celular em endósporos. Adaptado de (SCHÜRMANN *et al.*, 2014)

Em relação às proteínas ancoradas na membrana, dois sistemas, baseados em PgsA ou em NCgl1221 (Figura 7), foram explorados em sua maioria para aplicação em biocatálise. O sistema de ancoragem focado em PgsA é derivado do complexo poli- γ -glutamato PgsBCA de *B. subtilis*. Está envolvido na ancoragem do complexo de síntese e no “sempre presente” transportador poli- γ -glutamato. Possui apenas uma região transmembrana na região N-terminal e proteínas heterólogas são fundidas à região C-terminal para apresentação em superfície. O segundo sistema de ancoragem para bactérias gram positivas é NCgl1221 originada da *Corynebacterium glutamicum*. É uma proteína canal a qual contém quatro regiões transmembrana e assume-se que está envolvida na

secreção de L-glutamato. As proteínas heterólogas alvo são ligadas à região C-terminal (SCHÜÜRMANN *et al.*, 2014).

Além destas, recentemente endoesporos formados por espécies de *Bacillus* também têm sido empregados para display em superfície de enzimas recombinantes. Os endósporos são formados dentro das células mãe, a qual lisa ao final do processo de esporulação. A cobertura do esporo consiste de múltiplas camadas, responsáveis pela sua resistência única ao estresse. O display de enzimas em superfície é feito através da fusão da área C-terminal à proteínas como CotA, CotC, CotD e OxD internas e externas da cobertura do esporo (SCHÜÜRMANN *et al.*, 2014).

III.5 Métodos de Display em leveduras

A camada externa da parede celular de leveduras é composta por manoproteínas que estão ligadas às cadeias de β -1,3-glicano por, pelo menos, três maneiras diferentes (Figura 8). Algumas das proteínas são simplesmente adsorvidas às cadeias de β -1,3-glicano, enquanto outras são ligadas covalentemente, seja pela âncora glicosil phosphatidil inositol GPI e β -1,6-glicano, ou, como as proteínas da família Pir, através de ligação éster entre glutamato e glicose. Proteínas ligadas à parede celular não covalentemente são transportadas através da membrana plasmática e soltas no periplasma, onde são absorvidas pelas β -1,3-glicano a partir da formação de pontes de hidrogênio. As proteínas de membrana mais comumente usadas para o display em superfície de levedura são a α -glutina, a a-glutina e Flo1p (TEPARIC; MRSA, 2016).

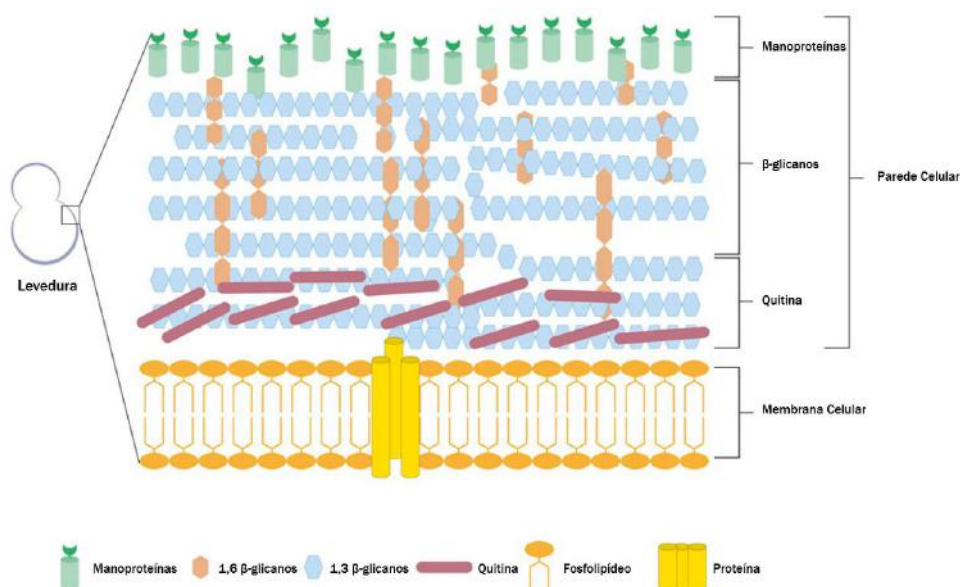


Figura 8: Esquema de membrana e parede celular de levedura. Adaptado de:

<https://www.mazzoleni.com/en/news/yeast-cell-wall-benefits-all>

III.5.1 – GPI

As proteínas âncora GPI usadas para o sinal de ancoragem GPI para o display de proteínas heterólogas em superfície celular são aglutinina, Sed1p e Cwp2p (TEPARIC; MRSA, 2016). As proteínas alvo são fundidas à essas proteínas que fornecem os meios de criar uma ligação covalente entre a proteína de fusão e as cadeias β -1,6-glicano da parede celular (DUQUESNE *et al.*, 2014).

III.5.2 – Aga

A α -glutina consiste de duas subunidades, a maior, aga1p é ancorada à parede celular via ancoragem GPI, enquanto a menor, Aga2p, é ligada a Aga1p através de ligação dissulfeto. Desta forma, a ligação da proteína alvo à Aga2p levaria a exposição na superfície celular (TEPARIC; MRSA, 2016).

III.5.3 – Pir

Ao contrário da ancoragem GPI, as sequências repetitivas Pir não são os únicos requisitos para a incorporação da proteína na parede celular e sua adição ao N-terminal de outra proteína não levaria a uma ligação covalente em um glicano. Apenas a proteína Pir completa na sua conformação natural se liga de forma eficiente; portanto, para alcançar com sucesso o display em superfície de uma proteína a partir do N-terminal, uma proteína composta da Pir completa e a proteína alvo teria de ser criada (Figura 9) (TEPARIC; MRSA, 2016).

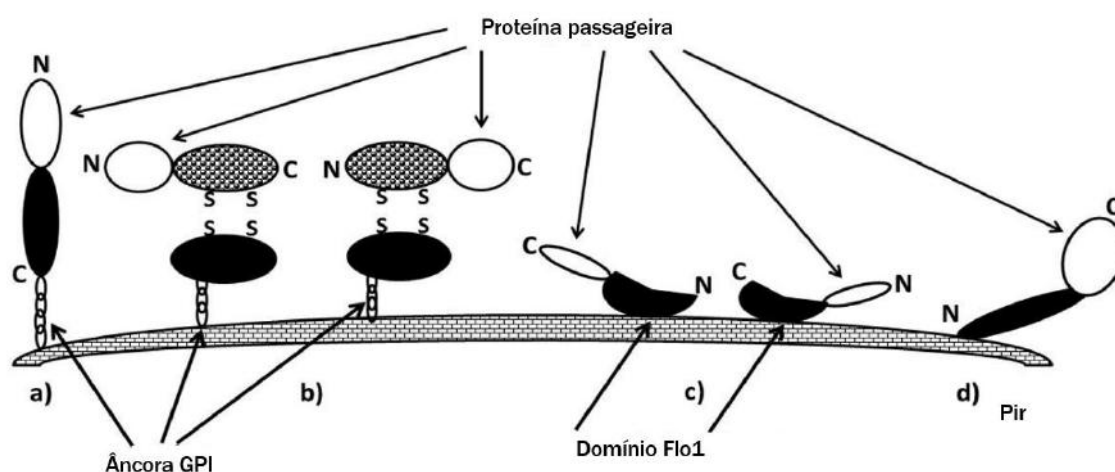


Figura 9: Sistema de display em superfície celular de *S.cerevisiae*: a Sistema de display GPI; b sistema de display a- glutinina; c sistema de display Flo1p; d sistema de display Pir. Adaptado de (TEPARIC; MRSA, 2016)

III.6 Aplicações

A combinação de diferentes plataformas, sistemas de ancoragem e enzimas abrem a possibilidade de um amplo uso em aplicações. Processos biocatalíticos como hidrólise de biomassa lignocelulósica foram estudados utilizando display de β -glicosidase em *Bacillus subtilis* empregando o domínio CWB_b de autolisina CwlB como âncora (GUPTA; NORONHA, 2020). A utilização de xilanase em *Yarrowia lipolytica*, enzima que também é usada na indústria de papel, biorrefinaria e no processamento de alimentos também foi testada (DUQUESNE *et al.*, 2014). Na indústria alimentícia, *Pichia pastoris* foi utilizada para o display da LipaseB de *Candida antártica*, comparando dois sistemas diferentes de ancoragem, a α -aglutinina e a Flo Ip, para síntese de éster flavorizantes. A enzima β -galactosidase, usada para síntese de probióticos galacto-oligossacarídeos, foi utilizada para display em *Lactobacillus spp* (PHAM *et al.*, 2019). O display pode ser usado também em sistemas mais complexos, como membranas biocatalíticas (BCMs), onde em seus microporos são imobilizadas células, com enzimas lacases imobilizadas em sua superfície (CHEN, Yingying *et al.*, 2018) ou em células microbianas de combustível onde leveduras serviram de plataforma para imobilização de enzimas redutoras de O₂, utilizando α -aglutinina como âncora (SZCZUPAK; KOL-KALMAN; ALFONTA, 2012), e, ainda, com um complexo de diferentes enzimas, glicoamilase e glicose oxidase na superfície celular para células microbianas de combustível.

IV. Prospecção tecnológica

IV.1 Metodologia

IV.1.1 Bases e Buscas

Uma prospecção tecnológica é uma busca por novas tecnologias, novos produtos ou, até mesmo, entender a trajetória de uma tecnologia, por meio de análises dos dados coletados.

Para avaliar a tendência do desenvolvimento da tecnologia de display celular de enzimas foi realizada uma prospecção tecnológica, onde foram pesquisados artigos científicos e patentes. As bases escolhidas foram o *Science direct* para os artigos científicos e o *Scopus* para as patentes, ambas ligadas a Elsevier. Todas as buscas foram feitas em junho de 2020.

Na base *Science Direct* foi selecionada a opção “busca avançada” e, no campo “find articles with these terms”, palavras chaves foram testadas para avaliar quais documentos retornavam da pesquisa. Além disso, foram selecionados os campos “review articles” e “research articles” com o objetivo de restringir a pesquisa apenas a artigos científicos. Os resultados da pesquisa foram classificados utilizando os critérios de relevância do *Science Direct*.

A base *Scopus* foi utilizada para as buscas das patentes. Primeiramente, para manter o mesmo intervalo de tempo dos artigos científicos, foi definido no campo “limite” publicação de 2010 a 2020. Posteriormente, foi selecionada a busca avançada e no campo “Enter query string” foram adicionados os termos “display” “cell surface” e “enzyme” utilizando o operador booleano “AND”. Depois de adicionados os termos, foi selecionada a aba “patents” onde mostra os resultados da pesquisa. Os resultados também foram classificados utilizando os critérios de relevância do *Scopus* os quais são os mesmos do *Science Direct*.

Para a análise, tanto dos artigos científicos quanto das patentes, foram feitas análises Macro, Meso e Micro.

IV.2 Análise Macro

A análise Macro corresponde aos aspectos mais gerais das publicações. Neste trabalho foram analisados os anos das publicações, os países e instituições que publicaram e, em quais revistas científicas foram publicados, no caso dos artigos científicos. Desta

análise pode-se ter uma visão das áreas onde a tecnologia está sendo empregada através do tipo de revistas científicas e da distribuição geográfica das publicações, além do desenvolvimento da tecnologia a partir do número de publicações pelos anos.

IV.3 Análise Meso

Na análise Meso foram definidas Taxonomias e seus critérios mostrados na Tabela 2. Nesta etapa cada documento é analisado e o conteúdo deste é classificado entre as taxonomias. Cada documento pode ser classificado em diversas taxonomias ao mesmo tempo. As taxonomias escolhidas foram, “Processo”, “Métodos de display”, “Biocatálise”, “Enzima”, “Otimização”, “Biorreator”, no caso das patentes as taxonomias utilizadas foram apenas “Processo”, “Métodos de display”, “Biocatálise” e “Enzima”, uma vez que “Otimização” e “Biorreator” são adequadas apenas aos artigos científicos. Além das taxonomias, nesta etapa, os artigos científicos e patentes também foram classificados em função da plataforma, ou seja, qual microrganismo foi utilizado para realizar o display.

Tabela 2: Taxonomias utilizadas para classificar os artigos científicos e patentes na prospecção tecnológica e suas descrições

Taxonomia	Descrição
Processo	Quando é descrito um Display específico para um processo
Métodos de Display	Quando a atividade enzimática é estudada em função do método utilizado
Biocatálise	Quando há um foco no tipo de reação feita pela enzima
Enzima	Quando é feito um estudo sobre enzimas específicas
Otimização	Quando são estudadas as condições ótimas para a atividade enzimática
Biorreator	Quando se estuda o display utilizando uma estratégia de condução

IV.4 Análise Micro

A análise Micro consiste em expandir os dados coletados na análise Meso. Enquanto na análise Meso são identificados os documentos que possuem determinada taxonomia, na análise Micro são definidas e estudadas as características particulares dos

documentos, como, por exemplo, quais processos foram abordados, quais enzimas tiveram mais destaque, ou quais reações bioquímicas foram mais recorrentes.

Esta análise permite ter uma visão geral de como a tecnologia está evoluindo, para quais áreas está expandindo, e como está sendo estudada.

IV.5 Critérios de relevância

Como informado anteriormente, o resultado das buscas foi classificado por relevância, a outra opção disponível para a classificação é por data. Tanto *Science Direct* como o *Scopus* utilizam o critério de relevância da Elsevier que consiste em um mecanismo de busca baseado em um cálculo estatístico (site Science Direct, https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28453/supporthub/sciencedirect/kw/Relevance/). Os critérios de relevância da Elsevier, baseados neste cálculo foram comparados com outros critérios utilizados para relevância no meio acadêmico como os fatores de impacto e *Cite Score* das revistas em que foram publicados e o número de citações de cada artigo acadêmico.

IV.6 Vosviewer

O Vosviewer é uma ferramenta gratuita para construção e visualização de relações bibliométricas. Este software foi utilizado para visualizar as relações entre as palavras chaves da pesquisa feita no *Science Direct*. A base de pesquisa do *Science Direct* permite baixar o arquivo da pesquisa no formato “.ris”, o qual é utilizado pelo software para fazer o mapeamento. No programa, foi utilizado o tipo de análise “Co-occurrence”, e marcada a opção “key words” como unidade de análise. O método de contagem escolhido foi a contagem fracionada. O número mínimo escolhido para a ocorrência da palavra chave foi de uma ocorrência, e todas foram selecionadas para ingressar no resultado.

V. Resultados e Discussões

V.1 Definição das palavras-chaves

Palavras chaves relacionadas ao tema foram testadas para avaliar se a busca retornava documentos que estivessem totalmente dentro do objetivo do estudo, que é o display de enzimas em superfície celular. O primeiro termo testado foi “display” retornando um total de 2.243.182 documentos. Este termo sozinho é genérico, podendo ser relacionado a vários assuntos diferentes. Os termos “cell” e “surface” foram testados em conjunto, retornando um total de 2.020.919 documentos. Vale ressaltar que, no campo da pesquisa, a expressão inicialmente foi adicionada sem aspas, o que indica, para a base, que estas duas palavras são procuradas separadamente nos documentos. Para que as palavras sejam procuradas como expressão é necessário adicionar as aspas. Utilizando as aspas, e, por consequência, pesquisando a expressão “cell surface”, o número de documentos retornados foi igual a 274.942. Por fim, o último termo testado foi “enzyme” retornando um total de 1.531.267 documentos.

Como era de se esperar todos estes termos e expressões separados ainda são genéricos, retornando, cada um, muitos documentos, então foram feitas pesquisas juntando estes termos. A junção dos termos “display” e “cell surface” obteve um total de 95.916 resultados, e foi possível observar que alguns dos resultados obtidos já atendiam os requisitos desejados. Porém muitos ainda não, principalmente pela falta de um termo especificando a presença de enzimas.

Levando isso em consideração, as combinações “display”/“enzyme” e “cell surface”/“enzyme” foram testadas, e tiveram como resultado 383.175 e 134.487 documentos, respectivamente. No primeiro caso, a busca não retornou resultados promissores, mostrando poucos documentos relacionados diretamente às duas palavras, enquanto, no segundo, os resultados foram melhores, retornando documentos que uniam os termos usados de forma mais coesa e com conteúdo mais ligado a ambos. Porém, a falta de termos como “display”, se referindo ao fato da enzima estar ancorada a superfície celular, fez com que os resultados não fossem suficientemente específicos para estar dentro da área abordada.

Deste modo, o termo “enzyme” foi testado no campo, “Title, abstract or author-specified keywords”, e foi observado que, como palavra-chave, não retornava apenas a palavra específica “enzyme”, como também qualquer enzima que estivesse listada nas

palavras chaves. Além deste, também foi adicionado o termo “surface display” pois este é comumente utilizado em artigos que abordam este assunto. Utilizando estes termos selecionados obteve-se um total de 130 documentos e, posteriormente, foi adicionado um limite de publicação de 2010 a 2020 para analisar o comportamento nos últimos 10 anos, retornando um total de 81 artigos. Deste total, 5 artigos ainda não atendiam os critérios de exclusão, de abordar o display de enzimas em superfície celular e foram excluídos resultando em um total de 76 artigos acadêmicos utilizados para a análise.

V.2 Artigos científicos

V.2.1 Análise Macro

Os resultados dos números de artigos científicos utilizando os termos “display”, “cell surface” e palavra-chave “enzyme” e “surface display” desde 1993 até o ano de 2019, podem ser vistos na Figura 10 e os resultados incluindo apenas os artigos científicos utilizados na análise, desde 2010 podem ser vistos na Figura 11. Estes gráficos mostram uma tendência de aumento no volume de publicações evidenciando o crescimento da relevância do assunto, o ano de 2020 não foi incluído pois as pesquisas foram feitas no mês de julho, o que não incluiria as publicações feitas até o final do ano, não sendo possível obter os números de maneira precisa.

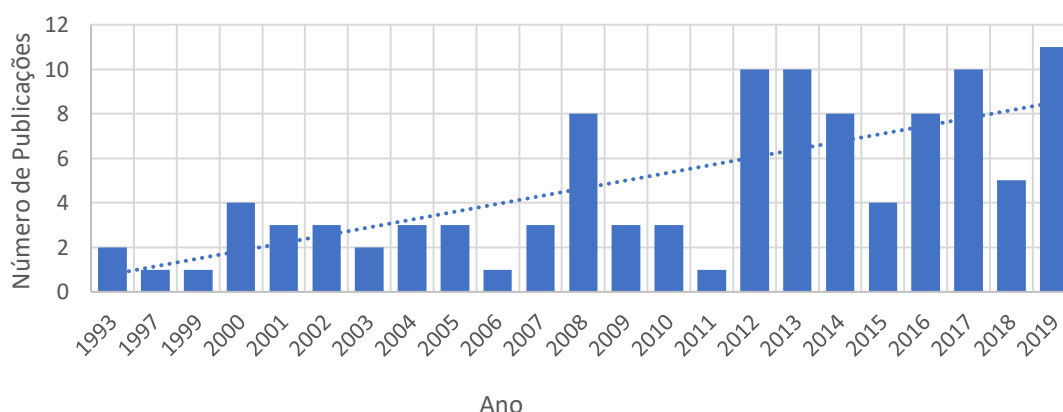


Figura 10: Número de publicações desde 1993 contendo as palavras chaves “display”, “cell surface”, “enzyme” e “surface display” (dados obtidos na base *Science Direct*).

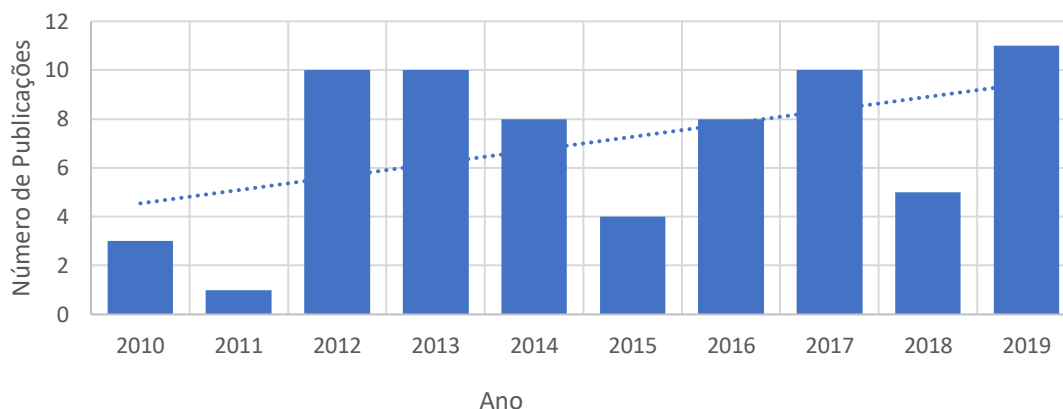


Figura 11: Número de publicações dos artigos científicos utilizados na análise, desde 2010, contendo as palavras chaves “display”, “cell surface”, “enzyme” e “surface display” (dados obtidos na base *Science Direct*).

Todos os artigos científicos analisados foram desenvolvidos por universidades, não foi constatado nenhum artigo científico produzido por grupo brasileiro. Em um caso específico, além do centro universitário houve ainda a participação da Bio-energy Cooperation, uma empresa russa de energia. Um total de 14 países foram responsáveis pelas publicações. A distribuição destes no mundo é mostrado na Figura 11. Esta distribuição nos mostra que, apesar de haver publicações na América e Europa, 75% destas foram do oriente médio e extremo oriente. A China sozinha foi responsável por 32 artigos, i.e. 42% das publicações analisadas.



Figura 12: Distribuição geográfica dos países que publicaram os artigos científicos utilizados na análise

Os artigos científicos foram publicados em 33 revistas científicas diferentes. O periódico que apresentou maior número de publicações foi a *Enzyme and Microbial Technology*, com 12 artigos. A relação das revistas científicas, e o número de publicações de cada pode ser visto na Tabela 3. A variedade de revistas é uma indicação da versatilidade desta tecnologia, permitindo a sua empregabilidade em diversas aplicações. Revistas científicas de mesmas áreas estão presentes como a *journal of biotechnology* e a *new biotechnology*, relacionadas diretamente com biotecnologia, porém há também revistas de diferentes campos de estudo como a *European journal of pharmaceutical Sciences*, voltada para as ciências farmacêutica, a *Animal Feed Science and Technology*, ligada à pesquisa em nutrição animal, a *Colloids and surfaces B:biointerfaces* a qual explora pesquisa aplicada em coloides e fenômenos interfaciais em relações com sistemas de origem biológica, a *Renewable and Sustainable Energy Reviews* a qual tem como objetivo comunicar pensamento crítico e relevante sobre energia renovável e sustentabilidade e a *Journal of Hazardous materials* a qual publica artigos na área de ciências ambientais e engenharia.

Tabela 3: Revistas científicas e número de publicações

Revistas científicas	Número de publicações
<i>Enzyme and Microbial Technology</i>	12
<i>Bioresource Technology</i>	8
<i>Journal of Biotechnology</i>	7
<i>Biochemical Engineering Journal</i>	5
<i>Biosensors and Bioelectronics</i>	5
<i>Journal of Bioscience and Bioengineering</i>	5
<i>Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic</i>	4
<i>Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes</i>	2
<i>New Biotechnology</i>	2
<i>Process Biochemistry</i>	2
<i>Protein Expression and Purification</i>	2
<i>Computational and Structural Biotechnology Journal</i>	1
<i>Analytica Chimica Acta</i>	1
<i>European Journal of Pharmaceutical Sciences</i>	1
<i>FEBS Open Bio</i>	1
<i>Fungal Biology</i>	1
<i>International Journal of Medical Microbiology</i>	1
<i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i>	1
<i>Animal Feed Science and Technology</i>	1
<i>Journal of Cleaner Production</i>	1
<i>Journal of Hazardous Materials</i>	1
<i>Journal of Membrane Science</i>	1
<i>Bioelectrochemistry</i>	1
<i>Metabolic Engineering Communications</i>	1
<i>Chinese Journal of Chemical Engineering</i>	1
<i>Procedia Technology</i>	1
<i>Chemistry & Biology</i>	1
<i>Chemosphere</i>	1
<i>Renewable and Sustainable Energy Reviews</i>	1
<i>Science of The Total Environment</i>	1
<i>Sensors and Actuators B: Chemical</i>	1
<i>Tetrahedron: Asymmetry</i>	1
<i>Trends in Biotechnology</i>	1
Total	76

V.2.2 Análise Meso

As plataformas utilizadas nos artigos são apresentadas na Figura 13 assim como o número de artigos científicos classificados em cada taxonomia pode ser visto na Figura 14. Em relação às plataformas, podemos observar que a utilização, tanto de leveduras, quanto de bactérias é equilibrada, 37 para bactérias e 33 para leveduras, sendo que 3 artigos abordavam o display em ambas as plataformas ou comparavam os seus resultados.

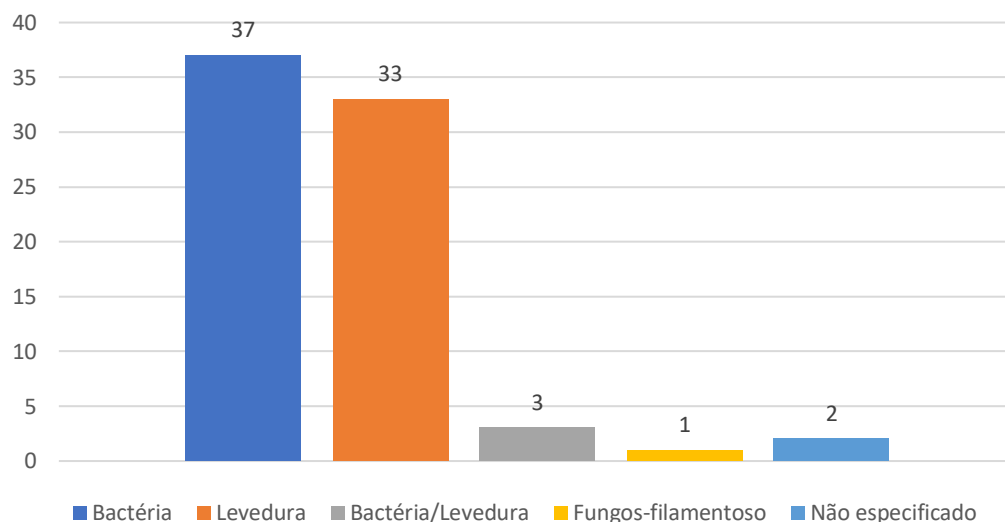


Figura 13: Número de artigos científicos classificados por plataformas

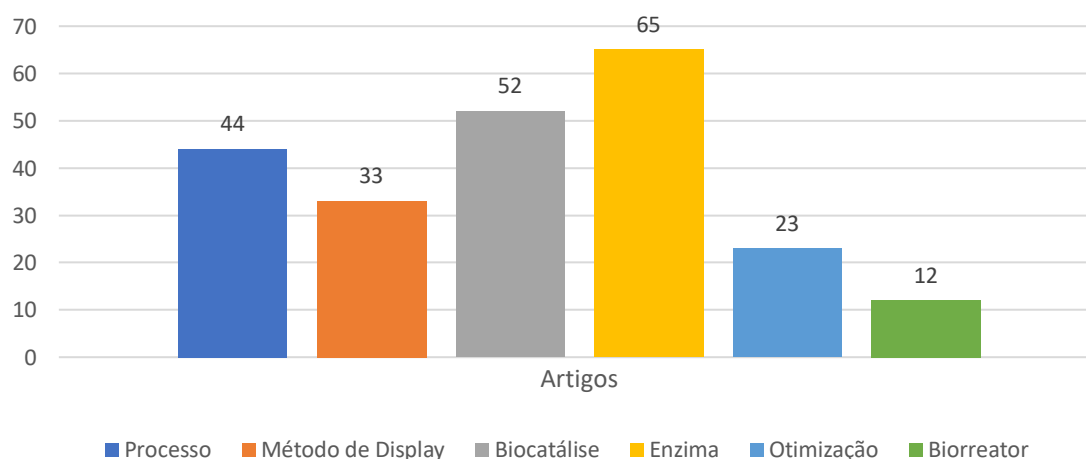


Figura 14: Número de artigos científicos classificados em cada taxonomia adotada na análise Meso

Em relação às taxonomias, podemos observar que a mais recorrente foi “enzima” o que indica que, dos 76 artigos científicos, 65 eram bem claros em informar qual enzima foi utilizada, focando na atividade catalítica da mesma. Seguindo a linha da taxonomia

anterior, a segunda mais recorrente, “biocatálise”, a qual obteve 52 artigos, e indica que grande parte do total focava em qual tipo de reação biocatalítica ocorria. A combinação destas taxonomias indica uma preocupação maior com a especificidade do processo, com cada artigo focando em enzimas e reações biocatalíticas específicas. Ainda aparecendo em mais da metade dos artigos, a taxonomia “aplicação” mostra quais são as áreas e atividades específicas onde se pretende aplicar esta tecnologia, e que grande parte destes artigos científicos tem como objetivo desenvolver a tecnologia para esta aplicação, mais do que estudar algum aspecto teórico, ou fazer algo mais voltado a pesquisa básica.

Um total de 33 artigos científicos foram classificados na categoria “métodos de display”. Como já foi apontado anteriormente neste trabalho, há uma grande variedade de sistemas para a aplicação do display, porém, alguns são mais estudados e, por consequência, mais utilizados. Menos da metade dos artigos científicos abordaram o uso específico de um método, o estudo, otimização ou comparação destes métodos. Todavia, o fato de ainda ser um número relativamente significativo mostra o interesse de melhorar ou apresentar um sistema mais eficiente de método de display. A taxonomia “otimização” apareceu com menor frequência, normalmente associada a outras taxonomias. Não foi incomum haver a otimização de um processo depois de definido o método de display, ou ainda para conseguir melhores resultados em uma aplicação. Por fim, a taxonomia “biorreator” apareceu 12 vezes, onde foram sugeridos e estudados equipamentos específicos para a utilização dos microrganismos.

V.2.3 Análise Micro

Na taxonomia “Enzimas” foram encontradas uma grande variedade destas, resultando em um total de 41 enzimas diferentes. As enzimas mais recorrentes foram relacionadas à catálise de xilose como β -xilosidase, xilanase, xilose desidrogenase e xilose redutase, totalizando 9 artigos. Um total de 7 artigos científicos abordaram processos envolvendo lipases e 4 envolvendo peroxidases. Os artigos científicos classificados na taxonomia “Biocatálise” abordaram 10 processos biocatalíticos diferentes, sendo o mais recorrente a hidrólise, totalizando 25 artigos, seguida por reações de oxirredução, com 19 e transesterificação e esterificação com 4 e 3, respectivamente.

A taxonomia “Processo” apresentou 22 processos diferentes, os processos mais recorrentes foram aqueles relacionados aos biocombustíveis, 10 artigos científicos no total, 6 abordando a produção de bioetanol, 2 sobre biodiesel e 1 usando tanto a palavra

biogás quanto o termo genérico biocombustível no artigo científico. Outros 10 artigos científicos abordavam assuntos relacionados a processos ambientais, como: biorremediação do corante trifenilmetano (GAO *et al.*, 2014), corantes azo (ILIĆ ĐURĐIĆ; OSTAFE; *et al.*, 2020) e de corantes industriais, produtos farmacêuticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e ácido húmico de carvão (ILIĆ ĐURĐIĆ; ECE; *et al.*, 2020), detecção de pesticidas; tratamento de resíduos; biosolvente e redução de CO₂. Além destes assuntos gerais, 8 artigos científicos desenvolviam biosensores de organofosforados (TANG *et al.*, 2014) e L-glutamato (LIANG *et al.*, 2015), e 2 eram relacionados com a indústria farmacêutica com a degradação de efluentes de antibióticos como eritromicina (LIU *et al.*, 2020) e produção de intermediários de drogas anti-HIV como a γ -lactama (WANG *et al.*, 2017).

A taxonomia referente aos “Métodos de display” apresentou um total de 33 artigos científicos. Nestes artigos foram encontrados 12 métodos diferentes, sendo o mais frequente a INP, reforçando a ideia de que este seria o sistema mais utilizado para bactérias. Os 23 artigos que envolviam otimizações tinham como principal objetivo fazer a otimização de diferentes parâmetros dos processos, como temperatura e pH, composição do meio de cultura e quantidade de enzimas na superfície celular. Um total de 12 artigos científicos foi classificado na taxonomia de “Biorreatores”, obtendo um total de 7 sistemas diferentes, como por exemplo, sistema em batelada alimentada (ONODERA *et al.*, 2017), biorreator com membrana (CHEN, Yingying *et al.*, 2018), *scale-up* com um fermentador de 3L (LIANG *et al.*, 2013), células de biocombustível baseada em xilose/O₂ (FENG *et al.*, 2016) e nanotubos de carbono de múltiplas camadas (LI *et al.*, 2012).

Grande parte dos processos envolvem a produção de bioetanol a partir de material lignocelulósico, fazendo uso de xilanases e outras hidrolases. Desta forma, é previsível que taxonomias que se complementam, como a hidrólise na “biocatálise” e xilanases nas “enzimas” mostrem maior relevância nos números finais de artigos científicos. Denota-se assim a necessidade do desenvolvimento desse processo, uma vez que a utilização de material lignocelulósico como matéria prima para produção de biocombustíveis pode ser de grande valor, pois estaria fazendo uso de um resíduo e gerando valor a partir deste. Desta forma, o desenvolvimento deste tipo de processo pode trazer vários benefícios e dirigir indústrias para uma via mais sustentável. A utilização da tecnologia do display de enzimas em superfície celular para produção de etanol, a partir de matéria prima lignocelulósica, possui potencial pois pode diminuir etapas do processo permitindo a

junção de diferentes etapas de pré-tratamento ou diminuindo o custo do processo, ao fazer uso de diferentes enzimas como co-display de enzimas em WC, permitindo também fácil separação e reutilização, aliado ao fato de diminuir o custo de purificar ou adquirir enzimas purificadas.

V.3 Patentes

V.3.1 Análise Macro

Foram utilizadas um total de 50 patentes para a análise. A Figura 14 mostra os anos que as patentes utilizadas para análise foram depositadas no período entre 2010 e 2020 utilizando as palavras chaves “display”, “cell surface”, “enzyme”, onde podemos observar que o ano onde houve maior quantidade de patentes foi em 2013.

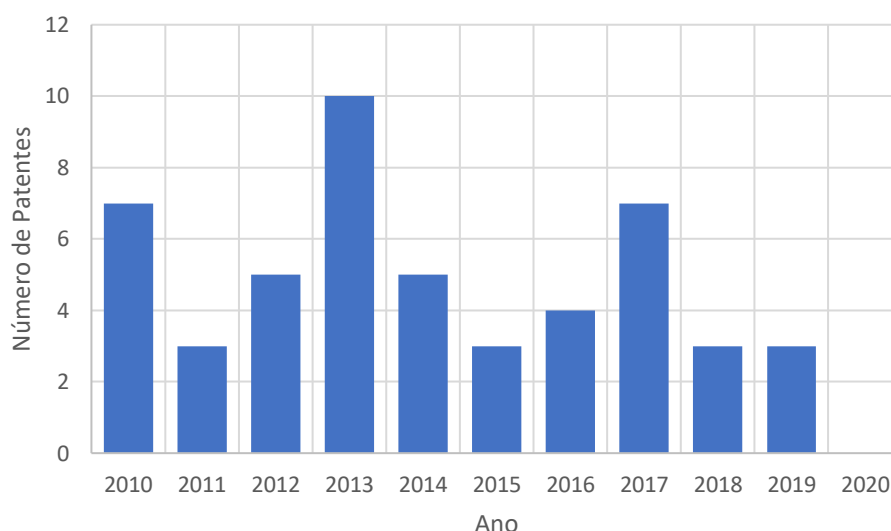


Figura 15: Distribuição no período entre 2010 e 2020 das patentes analisadas (fonte: base de dados *Scopus*)

No total, 8 países diferentes aplicaram patentes no período citado. Houve 50 aplicantes diferentes; destes 17 são empresas, 25 são centros universitários, 02 são uma cooperação entre empresa e universidade. Um hospital e uma agência governamental aplicaram 01 patente cada, e em 04 não foram encontradas informações sobre os depositantes. A Figura 15 mostra a distribuição de patentes por cada país. Ao contrário dos artigos científicos, o país que mais depositou patentes foi EUA com 26 patentes seguido pelo Japão o qual aplicou 10 patentes, a Coreia do Sul aplicou 07, Brasil, Grã-Bretanha, Holanda e Israel aplicaram 01 patente cada. A patente brasileira foi aplicada pela Universidade de São Paulo, em 2014, e abordava a construção e inserção de um vetor

de DNA plasmidial em bactérias gram negativas com o objetivo de ancorar uma proteína quelante para íons de arsênio em sua superfície.

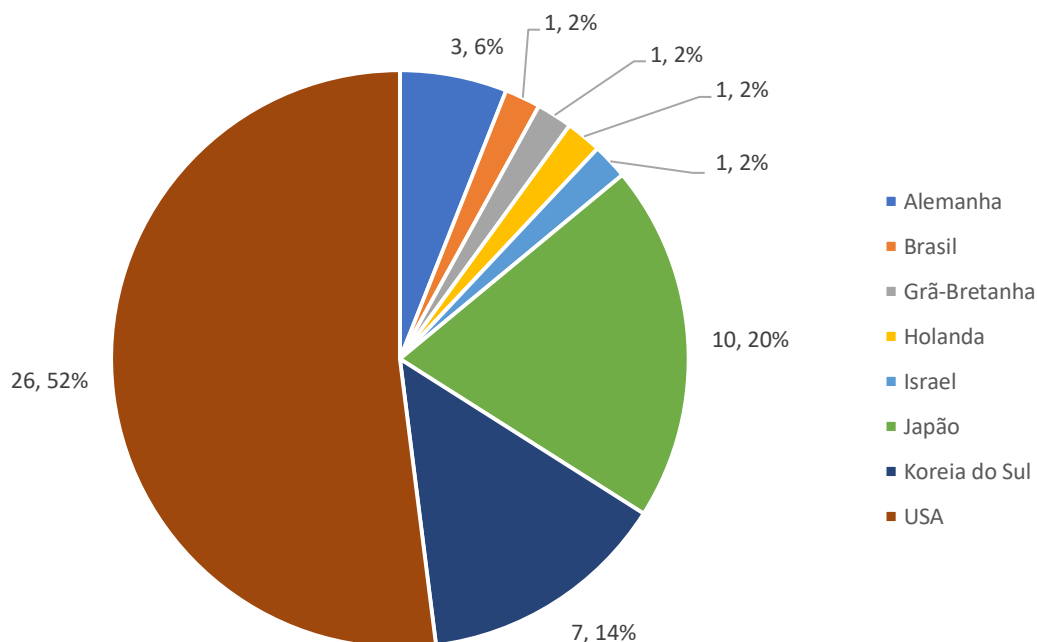


Figura 16: Países que aplicaram patentes utilizadas na análise entre os anos de 2010 e 2020.

V.3.2 Análise Meso

Como informado anteriormente, as taxonomias utilizadas para as patentes serão “Processo”, “Métodos de display”, “Biocatálise” e “Enzimas”. O número de patentes classificadas em cada taxonomia, assim como as plataformas utilizadas podem ser vistas nas Figuras 16 e Figura 17, respectivamente. Diferente dos artigos acadêmicos, a taxonomia mais recorrente foi “Métodos de display” com 40 patentes, seguido por “Processos” com 16 e enzimas com 10, e 05 patentes foram classificadas em “Biocatálise”.

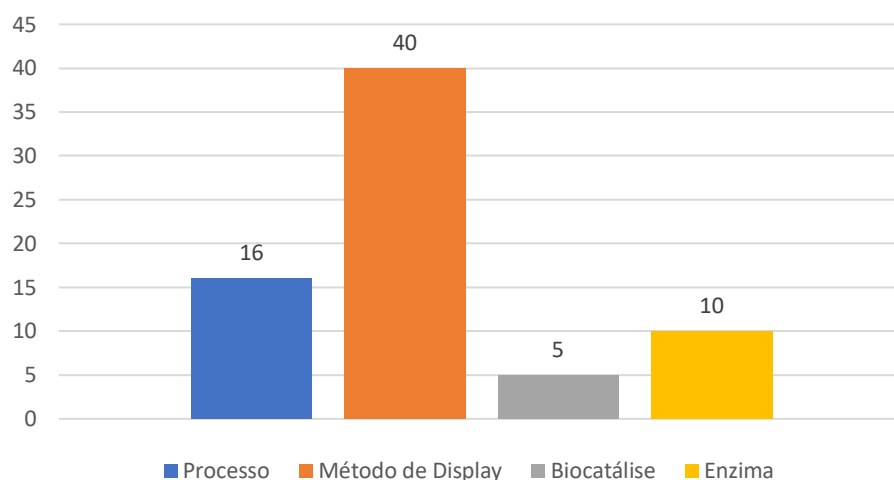


Figura 17: Número de patentes classificadas para as taxonomias definidas na análise Meso

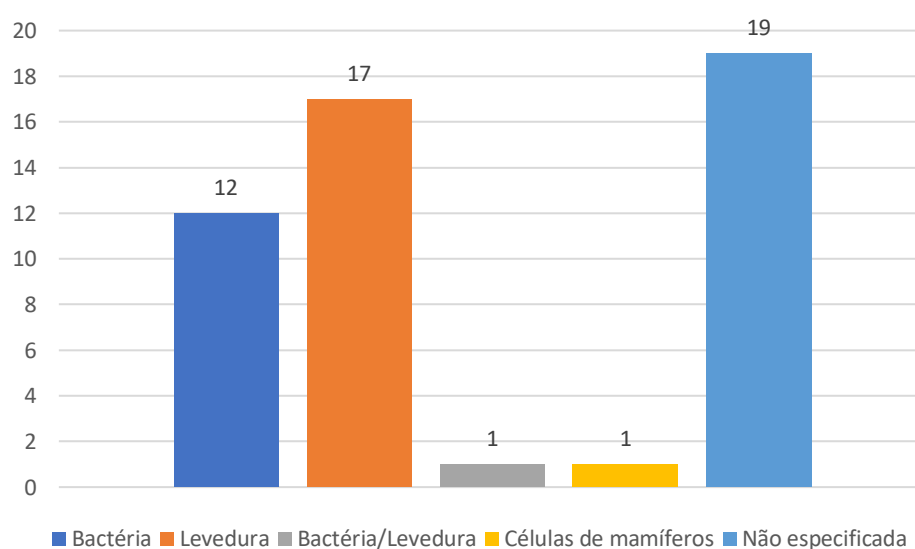


Figura 18: Classificação das patentes utilizadas na análise por plataformas

As patentes focam em defender determinados métodos e sequências de transformações para realizar o display, assim como algumas informam para qual aplicação especificamente a construção seria usada. Desta forma é natural que “Método de display” seja a taxonomia mais recorrente.

V.3.3 Análise Micro

A taxonomia mais recorrente foi “método de display”, porém as descrições não eram muito claras em informar qual era o sistema utilizado, as patentes classificadas nesta

taxonomia focavam em informar uma construção específica para o display, normalmente constituída de uma sequência genômica para um DNA plasmidial com o objetivo de fazer a proteção desta construção. A segunda taxonomia mais recorrente, “processos” obteve um total de 16 patentes, não houve incidência significativa de um processo específico: 04 deles podem ser classificados em bioenergia, produção de etanol e bioetanol, bioeletricidade e biocombustível; 02 patentes eram relacionadas a processos farmacêuticos, para a produção de um fármaco, e com uma terapia pro-fármaco. Outras 03 patentes focavam no processo de produção de adoçante, na degradação de celulose e em biorremediação.

As enzimas mencionadas foram anidrase carbônica, oxiredutase, glicosil amilase, e celulase, enquanto a “biocatálise” apresentou 03 patentes que abordavam hidrólise e 02 com reações de oxirredução.

V.4 Critérios de relevância

O critério de relevância da Elsevier consiste de um cálculo que é feito baseado nos termos utilizados para a pesquisa, atribuindo pontos às palavras chaves utilizadas em função de 6 fatores, os documentos com a maior pontuação, levando em consideração o somatório destes fatores, seriam os mais relevantes.

O primeiro dos critérios é o número de incidência, o qual indicaria que, quanto mais recorrente, mais relevante este termo é, para o tópico abordado. Desta forma o número de vezes que um termo aparece em documento desempenha um papel importante na relevância.

O segundo fator levado em consideração é a significância de uma palavra. As palavras não são igualmente importantes, uma palavra que está presente em quase todos os documentos faz uma pontuação menor do que uma palavra incomum. A base de dados *Science Direct* utiliza cálculos baseados na Frequência do Termo (FT) / Inverso da Frequência do Documento (IDF), para assinalar pesos para cada palavra em particular no documento. Por exemplo, a palavra “célula” é passível de ser encontrada em várias áreas de estudos diferentes, no entanto a palavra “autotransportadora” é menos comum em outras áreas, e terá mais impacto no ranqueamento.

O local onde o termo é encontrado é outro fator levado em consideração. Se um determinado termo é encontrado no título, no resumo e nas palavras chaves de um artigo científico então, provavelmente, ela é importante. No entanto, se a palavra é encontrada

apenas nas referências, provavelmente ela não é importante. Para demonstrar este contraste são assinalados diferentes pesos para diferentes seções do documento.

Assim como o local onde os termos se encontram contam para o cálculo final, o quanto antes, no documento, o termo é mencionado, faz com que seja mais provável que ele seja importante. Portanto a posição da primeira ocorrência contribui para o ranking.

A proximidade é outro fator importante para o cálculo, quanto mais próximos diferentes termos da pesquisa estão, maior é a pontuação. Por fim, se uma pesquisa consiste de várias palavras, então um documento que possui todas as palavras em um mesmo campo terá uma pontuação maior, quando comparado com outro que possui todas as palavras, porém espalhadas pelo documento.

Apesar de consistir de um cálculo, com fatores e pesos bem determinados, este critério de relevância pode não refletir o quão relevante para a comunidade científica um documento é, uma vez que não leva em conta o quanto um documento realmente é usado pelos seus pares, com citações ou o fator de impacto das revistas nas quais foram publicados.

Foram pesquisados os fatores de impacto e o *Cite Score* de cada revista científica presente no estudo, além do total de citações de cada artigo. O fator de impacto de uma revista é a média de citações recebidas por pares em um determinado ano, considerando os dois anos anteriores, enquanto o *Cite Score* mede a média de citações recebidas por documento publicado. A média do fator de impacto das revistas foi de 4,78 e do *Cite Score* de 4. Para analisar a média de citações recebidas por artigo, foi calculada a média de citações por ano, uma vez que a faixa de período escolhida foi de 10 anos, e se utilizássemos o total de citações os artigos mais recentes poderiam ser prejudicados. A média calculada foi de 03 citações por ano e a média de citações totais é de 16, Tabela 4. Das 33 revistas científicas utilizadas no estudo 03 foram descontinuadas.

Tabela 4: Médias dos critérios subjetivos dos artigos científicos utilizados na Prospecção Tecnológica

	Fator de Impacto	<i>Cite Score</i>	Citações/ano	Citações
Média	4,78	4	3	16

Levando em consideração a comparação das médias encontradas e a posição de cada documento classificado de acordo com os critérios da Elsevier, observa-se que os

resultados encontrados utilizando os critérios da Elsevier são muito diferentes dos resultados que seriam encontrados utilizando os outros critérios.

O primeiro artigo, resultado da pesquisa no *Science direct*, ou seja, o mais relevante, de acordo com os critérios por eles estabelecidos, foi publicado em 2020, e obteve um total de 2 citações. A revista “Science of total environment” onde foi publicado possui um fator de impacto de 6.551 e um cite score de 8.6, colocando o artigo significativamente acima das médias, menos em relação às citações diretas, provavelmente em função do pouco tempo de publicado. Porém, o segundo artigo, o qual também foi publicado em 2020, é da revista “Protein expression and Purification”, a qual possui um fator de impacto de 1.533 e cite Score de 2.8, além de não ter tido nenhuma citação, colocando-a bem abaixo da média em todos os critérios. Em comparação, o quarto artigo em relevância pela Science Direct, foi publicado na “Sensors and Actuators B: Chemical”, a qual possui um fator de impacto de 7.1 e *Cite Score* de 11.8. Publicado em 2019, o artigo obteve 7 citações no total, e uma média de 4 citações por ano, ficando acima do primeiro artigo se utilizarmos os critérios mencionados. A situação é parecida com o sétimo artigo na lista do Science direct, publicado no ano de 2017 pela “Bioresource Technology” com um fator de impacto de 7.539 e *Cite Score* de 12.8. O mesmo obteve, até a data da pesquisa, 13 citações, com uma média de 3 citações por ano. O caso mais extremo da discrepância entre os critérios de relevância é do artigo número 75 da lista do Science Direct, penúltimo nos critérios de relevância. Publicado pela revista “Trends in Biotechnology” em 2013, teve um total de 72 citações com média de 9 por ano, a revista possui fator de impacto de 14,343 e *Cite Score* de 23,1.

Com isso chegamos à conclusão que os critérios de relevância do Science Direct mostram um tipo diferente de relevância, não levando em consideração a interação da comunidade científica com o artigo ou a revista apenas focando em aspectos estruturais do texto e das palavras chaves utilizadas. Esta é uma forma de se classificar os documentos, porém pode não ser a mais eficiente, uma vez que, ao procurar por estes documentos, a tendência é dar prioridade para aqueles que receberam mais respaldo da comunidade científica. A obtenção de dados e o uso destes em fórmulas matemáticas pode ser uma boa ferramenta para indicar quais artigos seriam mais relevantes em um determinado assunto. Porém, o fator determinante para definir isto ainda é humano, ou seja, a interação dos cientistas com o artigo, e o quanto este é utilizado como base para futuros trabalhos. Desta forma, uma avaliação de relevância levando em consideração unicamente aspectos estruturais do texto deixa muito a desejar ao se definir quais são os

documentos realmente mais relevantes para a comunidade científica. A base de dados dispõe de uma classificação por relevância para facilitar o trabalho do pesquisador, porém, pode levar a erros de julgamento ao retornar documentos relevantes estruturalmente mas não tão relevantes socialmente, principalmente quando estamos lidando com um volume muito grande de documentos. Faz-se necessário, portanto, adicionar um fator a ser considerado no somatório de pontos de origem mais subjetivo, de interação da comunidade científica com os documentos, como número de citações ou o fator de impacto das revistas.

V.5 Vosviewer

A imagem com as relações entre palavras chaves pode ser vista na Figura 18. Podemos observar *clusters* que são as palavras chaves que estão interligadas. Há também ligações de diferentes *clusters* por palavras chaves específicas. Podemos fazer algumas ligações a partir destas palavras chaves. Ao escolher a palavra-chave lipase, por exemplo, o caminho destacado leva à palavra chave “yeast surface display”, o que indica uma relação forte entre as lipases e o uso de leveduras como plataforma primária para este tipo de enzima. Quando destacamos o termo “Ice nucleation protein” o software mostra ligações com as palavras “bacterial surface display” e “xylanase”, o que indicaria que a plataforma e o sistema que têm sido utilizados para o display de xilanases são bactérias com o sistema INP. Porém, ao marcar “xylanase”, esta também se liga a palavra-chave “yeast surface display”, ou seja, ambas as plataformas estão sendo estudadas para fazer o display de xilanases. Escolhendo uma palavra chave específica como “hyaluronic acid” vemos uma única ligação levando a autodisplay, o que indica o uso de autotransportadoras como sistema de display, ligado às bactérias, evidenciando a preferência desse sistema para ácido hialurônico.

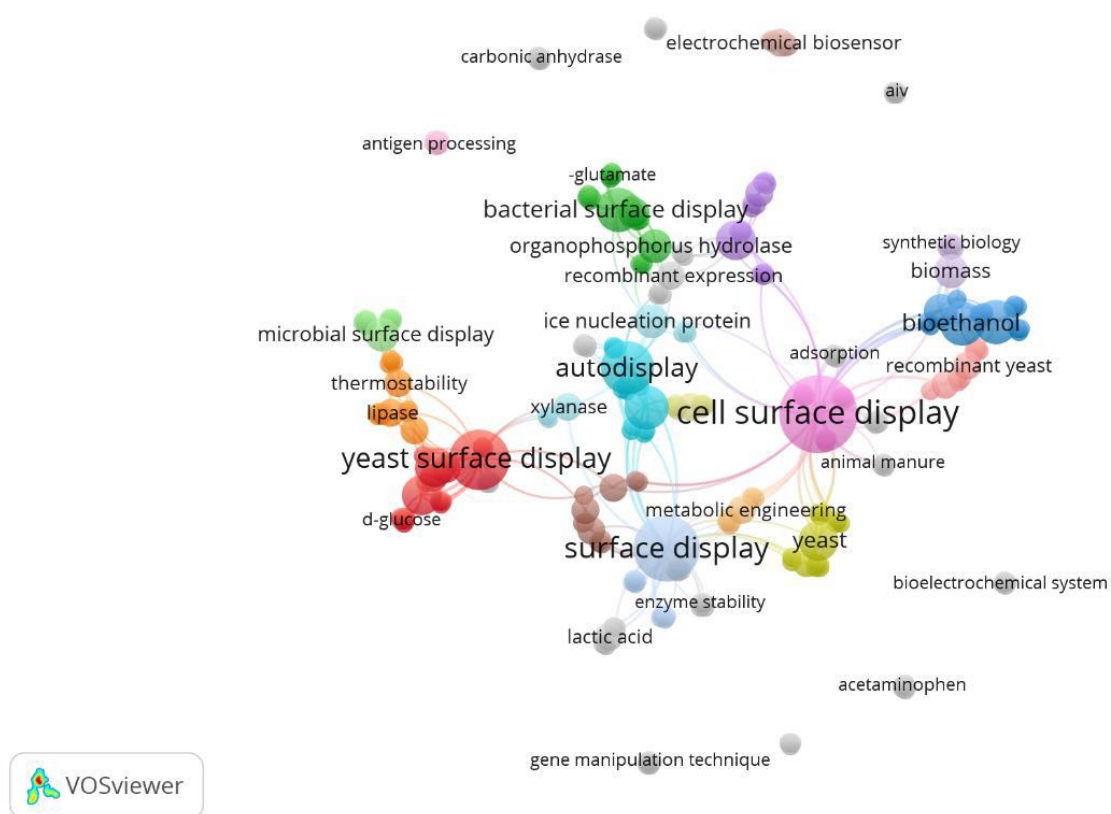


Figura 19: Mapas de relações entre palavras chaves gerado pelo Vosviewer

VI. Conclusões

A tecnologia do display de enzimas em superfície celular ainda está em amplo desenvolvimento, como mostra a linha de tendência dos para artigos científicos evidenciando um possível aumento no número de publicações nos próximos anos. A sua versatilidade, tanto de sistemas para montagem dos microrganismos, com diferentes plataformas, e combinações de proteínas âncoras e enzimas, quanto para as possibilidades de aplicações são pontos positivos. Os números de publicações de artigos científicos mostram um aumento no interesse, e, na medida que processos forem desenvolvidos e estabelecidos, há possibilidade das pesquisas aumentarem, abrindo para outras aplicações. Enquanto os artigos científicos focam em desenvolver novas técnicas fazendo uso de diferentes enzimas, diferentes reações bioquímicas, diferentes sistemas de ancoragem para diferentes aplicações, as patentes focaram mais em proteger métodos específicos, como construções de plasmídeos e sistemas de display, evidenciando os diferentes tratamentos dados à tecnologia quando se utiliza os artigos científicos e as patentes, e que há espaço para crescimento. Uma vez que os processos pesquisados se mostrem promissores, a evolução natural seria a aplicação da patente para fazer uso da tecnologia. A universidade se mostrou responsável pelas pesquisas na área, através da participação nos artigos científicos, havendo apenas uma parceria entre universidade/empresa enquanto a participação nas patentes foi equilibrada, mostrando o interesse de ambas em fazer uso da tecnologia, porém, atuando de forma independente uma vez que houveram apenas duas cooperações universidade/empresa para a aplicação de patentes. A análise mostrou que a área de aplicação mais estudada com a utilização desta tecnologia é do tratamento de material lignocelulósico, para produção de bioetanol, utilizando hidrolases como as xilanases.

Em relação ao critério de relevância de plataformas como o *Science Direct*, o trabalho mostrou que os algoritmos matemáticos não, necessariamente apresentam o mesmo resultado que os critérios qualitativos, como a reação dos pares de comunidade científica aos artigos, e que documentos muito bem pontuados pelos algoritmos matemáticos usados pela plataforma estariam em colocações muito inferiores em uma classificação quando comparados com parâmetros como fator de impacto, *cite score* e número de citações. Uma forma de resolver esta questão seria a adição de mais fatores para fazer o cálculo final da pontuação dos documentos, fatores que levam em consideração não apenas as

palavras chaves, mas também os fatores de impacto e os *Cite scores* das revistas científicas que foram publicados ou o número de citações que o artigo científico recebeu.

Por fim a tecnologia do display de enzimas em superfície celular possui um grande potencial para aplicação em diferentes áreas, porém ainda não parece ser uma tecnologia bem estabelecida. A combinação de pontos positivos de tecnologia WC e de imobilização de enzimas pode trazer inúmeros benefícios operacionais e econômicos, tendo como desafios ser melhor estudada, caracterizada e otimizada para que possa se tornar uma boa opção para ser aplicada em processos industriais.

VII. Referências Bibliográficas

- BASSO, Alessandra; SERBAN, Simona. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, 1 dez. 2019. DOI 10.1016/j.mcat.2019.110607. .
- BOUDRANT, Joseph; WOODLEY, John M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, v. 90, p. 66–80, 1 mar. 2020. DOI 10.1016/j.procbio.2019.11.026. .
- CARVALHO, Nayara B.; LIMA, Álvaro S.; SOARES, Cleide M.F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, Sílica para imobilização de lipases, artigo base de revisão., v. 38, n. 3, p. 399–409, 2014. DOI 10.5935/0100-4042.20140304. .
- CHEN, Yingying *et al.* Biocatalytic membranes prepared by inkjet printing functionalized yeast cells onto microfiltration substrates. **Journal of Membrane Science**, v. 550, p. 91–100, 15 mar. 2018. DOI 10.1016/j.memsci.2017.12.045. .
- CHEN, Zhuozhi *et al.* Efficient biodegradation of highly crystallized polyethylene terephthalate through cell surface display of bacterial PETase. **Science of the Total Environment**, v. 709, p. 136138, 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2019.136138. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136138>.
- CHMIELEWSKI, Markus *et al.* FimH-based display of functional eukaryotic proteins on bacteria surfaces. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019. DOI 10.1038/s41598-019-44883-z. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-44883-z>.
- CIESIELSKI, Adrian; GRZYWACZ, Robert. Dynamic bifurcations in continuous process of bioethanol production under aerobic conditions using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, n. October 2019, p. 107609, 2020. DOI 10.1016/j.bej.2020.107609. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107609>.
- DONG, Mosi *et al.* Optimization of production conditions of rice α -galactosidase II displayed on yeast cell surface. **Protein Expression and Purification**, v. 171, n. December 2019, p. 105611, 2020. DOI 10.1016/j.pep.2020.105611. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105611>.
- DUQUESNE, Sophie *et al.* Construction of a highly active xylanase displaying oleaginous yeast: Comparison of anchoring systems. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 17 abr. 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0095128. .
- FENG, Ruirui *et al.* Rational design of xylose dehydrogenase for improved thermostability and its application in development of efficient enzymatic biofuel cell. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 78–85, 2016. DOI 10.1016/j.enzmictec.2015.12.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.12.002>.

GAO, Fen *et al.* Functional display of triphenylmethane reductase for dye removal on the surface of *Escherichia coli* using N-terminal domain of ice nucleation protein.

Bioresource Technology, v. 169, p. 181–187, 2014. DOI

10.1016/j.biortech.2014.06.093. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.093>.

GUPTA, Reeshav; NORONHA, Santosh B. Utilization of *Bacillus subtilis* cells displaying a glucose-tolerant β -glucosidase for whole-cell biocatalysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 132, 1 jan. 2020. DOI 10.1016/j.enzmictec.2019.109444. .

HÖRNSTRÖM, David *et al.* Molecular optimization of autotransporter-based tyrosinase surface display. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1861, n. 2, p. 486–494, 2019. DOI 10.1016/j.bbamem.2018.11.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.012>.

ILIĆ ĐURĐIĆ, Karla; ECE, Selin; *et al.* Flow cytometry-based system for screening of lignin peroxidase mutants with higher oxidative stability. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 129, n. 6, p. 664–671, 2020. DOI 10.1016/j.jbiosc.2019.12.009. .

ILIĆ ĐURĐIĆ, Karla; OSTAFE, Raluca; *et al.* Saturation mutagenesis to improve the degradation of azo dyes by versatile peroxidase and application in form of VP-coated yeast cell walls. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 136, n. October 2019, 2020. DOI 10.1016/j.enzmictec.2020.109509. .

JIANG, Nan; MA, Lianju; LU, Yuan. Cell-free synthetic biology in the new era of enzyme engineering. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 2020. DOI 10.1016/j.cjche.2020.05.037. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.05.037>.

KAUSHIK, Nirmala; BISWAS, Soumitra; SINGH, Jagriti. Biocatalysis and Biotransformation Processes-An Insight. **Bioprocess & Bioproducts Programme**, v. 32, p. 16, 2014. .

LI, Liang *et al.* A selective and sensitive d-xylose electrochemical biosensor based on xylose dehydrogenase displayed on the surface of bacteria and multi-walled carbon nanotubes modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 33, n. 1, p. 100–105, 2012. DOI 10.1016/j.bios.2011.12.027. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.12.027>.

LIANG, Bo *et al.* Amperometric l-glutamate biosensor based on bacterial cell-surface displayed glutamate dehydrogenase. **Analytica Chimica Acta**, v. 884, p. 83–89, 2015. DOI 10.1016/j.aca.2015.05.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.012>.

LIANG, Bo *et al.* Simultaneously improving stability and specificity of cell surface displayed glucose dehydrogenase mutants to construct whole-cell biocatalyst for glucose biosensor application. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 492–498, 2013. DOI 10.1016/j.biortech.2013.08.088. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.088>.

LIN, Baixue; TAO, Yong. Whole-cell biocatalysts by design. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2017. DOI 10.1186/s12934-017-0724-7. .

LIU, Minrui *et al.* Reducing residual antibiotic levels in animal feces using intestinal *Escherichia coli* with surface-displayed erythromycin esterase. **Journal of Hazardous Materials**, v. 388, n. December 2019, p. 122032, 2020. DOI 10.1016/j.jhazmat.2020.122032. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122032>.

ONODERA, Kaoru *et al.* Development of fed-batch process for high-yielding B-glucosidase displayed on cell surface of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 128, p. 195–200, 2017. DOI 10.1016/j.bej.2017.09.016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.09.016>.

PARK, Ju Yong; KIM, Yang Hoon; MIN, Jiho. CO₂ reduction and organic compounds production by photosynthetic bacteria with surface displayed carbonic anhydrase and inducible expression of phosphoenolpyruvate carboxylase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 96, p. 103–110, 2017. DOI 10.1016/j.enzmictec.2016.10.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.10.005>.

PHAM, Mai Lan *et al.* Immobilization of β -galactosidases on the *Lactobacillus* cell surface using the peptidoglycan-binding motif LysM. **Catalysts**, v. 9, n. 5, 1 maio 2019. DOI 10.3390/catal9050443. .

PINTO, Andrea; CONTENTE, Martina Letizia; TAMBORINI, Lucia. Advances on whole-cell biocatalysis in flow. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 25, n. Table 1, p. 100343, 2020. DOI 10.1016/j.cogsc.2020.04.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.04.004>.

SCHÜRMANN, Jan *et al.* Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes: toward industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Revisão bibliográfica geral de atividade com Whole cell, boa para usar de base. e pegar referências que sejam acima de 2014., v. 98, n. 19, p. 8031–8046, 2014. DOI 10.1007/s00253-014-5897-y. .

SUN, Fang *et al.* BrkAutoDisplay: Functional display of multiple exogenous proteins on the surface of *Escherichia coli* by using BrkA autotransporter. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2015. DOI 10.1186/s12934-015-0316-3. .

SZCZUPAK, Alon; KOL-KALMAN, Dan; ALFONTA, Lital. A hybrid biocathode: Surface display of O₂-reducing enzymes for microbial fuel cell applications. **Chemical Communications**, v. 48, n. 1, p. 49–51, 4 jan. 2012. DOI 10.1039/c1cc16207a. .

TANG, Xiangjiang *et al.* Cell surface display of organophosphorus hydrolase for sensitive spectrophotometric detection of p-nitrophenol substituted organophosphates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p. 107–112, 2014. DOI 10.1016/j.enzmictec.2013.10.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.10.006>.

TEPARIC, Renata; MRSA, Vladimir. Overview of systems and techniques for surface

display of recombinant proteins in yeast *S. cerevisiae*. **Applied Food Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 3–14, 2016. DOI 10.22037/afb.v3i1.9457. .

TRUPPO, Matthew D. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 5, p. 476–480, 2017. DOI 10.1021/acsmmedchemlett.7b00114. .

VILLAYERDE, Antonio. Nanotechnology, bionanotechnology and microbial cell factories. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 2–5, 2010. DOI 10.1186/1475-2859-9-53. .

WANG, Yiyuan *et al.* Asymmetric biosynthesis of intermediates of anti-HIV drugs. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 28, n. 6, p. 745–757, 2017. DOI 10.1016/j.tetasy.2017.04.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.04.008>.

WEE, Mei Yui Joanne *et al.* Expression of xylanase on *Escherichia coli* using a truncated ice nucleation protein of *Erwinia ananas* (InaA). **Process Biochemistry**, v. 78, n. January, p. 25–32, 2019. DOI 10.1016/j.procbio.2019.01.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.005>.

XU, Ning *et al.* Combining protein and metabolic engineering to construct efficient microbial cell factories. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 66, p. 27–35, 2020. DOI 10.1016/j.copbio.2020.06.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.06.001>.